

Lúcia Cristina Coelho Cristino Mamede

Avaliação da atividade de novas alquil-ciclohexenonas de *Poupartia borbonica* sobre *Plasmodium falciparum*

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Avaliação da atividade de novas alquil-ciclohexenonas de *Poupartia borbonica* sobre *Plasmodium falciparum*” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dr^a. Sandra Queimado, do Dr. Jorge Augusto e do Professor Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro e Professora Allison Ledoux, e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Capa: foto de “Feuilles adultes *Poupartia borbonica* J.F. Gmel”, disponível em:

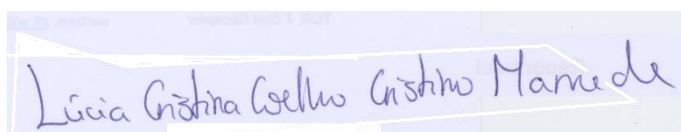
http://www.mi-aime-a-ou.com/Poupartia_borbonica.php

Declaração de Autoria

Eu, Lúcia Cristina Coelho Cristino Mamede, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012151480, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Avaliação da atividade de novas alquil-ciclohexenonas de *Poupartia borbonica* sobre *Plasmodium falciparum*” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 5 de setembro de 2017.



Lúcia Cristina Coelho Cristino Mamede

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Carlos Manuel Freire Cavaleiro, meu orientador da monografia, pela disponibilidade, conselho e motivação, sem o qual a mesma não seria possível.

À Professora Allison Ledoux, minha orientadora da monografia pela pronta integração no laboratório e inclusão no seu projeto de doutoramento, pelo apoio, carinho e ensinamentos.

Ao Doutor Jorge Augusto, diretor técnico da Farmácia Nuno Álvares e meu orientador do estágio em Farmácia Comunitária, pelo caloroso acolhimento.

A todos os colaboradores da Farmácia Nuno Álvares, Dr.^a Helena Mateus, Dr. Pedro Santos, Dr.^a Patrícia Pereirinha, Dr.^a Inês Margalho, Dr.^a Ana Marta Belo, Sr. Valentim Cardoso e Sr. João Serra, pela simpatia, amizade, disponibilidade e persistência com que transmitiram conhecimentos e contribuíram para a minha formação como farmacêutica. Bem-haja!

À Doutora Sandra Queimado, diretora técnica dos Serviços Farmacêuticos da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, pelas lições fundamentais.

A todos os colaboradores dos Serviços Farmacêuticos da ULSCB, E.P.E., por toda a simpatia e paciência.

À minha família, por me permitir trilhar este caminho e apoiar incondicionalmente em todas as decisões e projetos.

Ao meu irmão, pelos conselhos, apoio e orientação em todas as dificuldades deste percurso.

Aos meus amigos, os que me acompanharam desde cedo e os que fui tendo o prazer de conhecer pelo caminho, pelo apoio e alegria em todos os momentos.

E, por fim, ao João, meu namorado, amigo e companheiro. Muito obrigada pelo carinho, pelo apoio e por me dares sempre a perspetiva que preciso.

Índice

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Abreviaturas.....	v
1. Monografia – Evaluation of the activity of new alkyl cyclohexenones of <i>Poupartia borbonica</i> on <i>Plasmodium falciparum</i>	1
1.1. Introduction.....	2
1.1.1. Biology of <i>P. falciparum</i> and Malaria Disease.....	3
1.1.2. Cerebral malaria.....	5
1.1.3. Treatment of Malaria.....	7
1.1.4. The plant: <i>Poupartia borbonica</i>	9
1.1.5. The strategy: the formulation.....	12
1.1.6. Current study.....	15
1.2. Materials and Methods.....	17
1.3. Results.....	20
1.4. Conclusion.....	25
2. Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar.....	26
2.1. Introdução.....	27
2.2. Estrutura.....	28
2.3. Análise SWOT.....	32
2.3.1. Forças.....	32
2.3.2. Fraquezas.....	33
2.3.3. Oportunidades.....	33
2.3.4. Ameaças.....	34
2.4. O papel do farmacêutico.....	35
2.5. Conclusão.....	35
3. Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária.....	36
3.1. Introdução.....	37
3.2. Análise SWOT.....	38
3.2.1. Forças.....	38
3.2.2. Fraquezas.....	41
3.2.3. Oportunidades.....	41
3.2.4. Ameaças.....	43
3.3. Papel do farmacêutico.....	45

3.4. Conclusão	45
4. Bibliografia	46
5. Anexos	54
Anexo I	54
Anexo II	55
Anexo III	56
Anexo IV	57
Anexo V	58
Anexo VI	59
Anexo VII	60
Anexo VIII	61
Anexo IX	63
Anexo X	64
Anexo XI	65
Anexo XII	66
Anexo XIII	67
Anexo XIV	69
Anexo XV	73
Anexo XVI	75
Anexo XVII	76

Resumo

A monografia apresenta o trabalho executado na Universidade de Liège, Bélgica, aquando do estágio no âmbito do programa ERASMUS +. Este consistiu na continuação da investigação de compostos com atividade anti-plasmódica, nomeadamente, o composto Poupartone B extraído da planta *Poupartia borbonica*, endémica às Ilhas Mascarenhas. Este composto é o segundo da família de compostos extraídos desta planta a ser estudado quanto à sua possível aplicação no tratamento da malária cerebral. O trabalho experimental englobou diversos passos da investigação: extração, isolamento e purificação dos compostos, construção de lipossomas, validação e avaliação da estabilidade da formulação, quantificação da heparina, estudos de toxicidade num modelo com *zebrafish* e testes de eficácia *in vitro* em estirpes de *P. falciparum*. Durante a investigação novos compostos foram descobertos e investigados em simultâneo. A validação e estabilidade foram comprovadas e a aplicabilidade da formulação averiguada por meio dos ensaios referidos. Os novos compostos não revelaram qualquer eficácia, no entanto a formulação com Poupartone B proporcionou uma redução significativa da toxicidade comparativamente à utilização do composto isolado, bem como o aumento da eficácia do mesmo no parasita *in vitro*, viabilizando o seguimento da investigação para ensaios *in vivo*.

Os relatórios de estágio estão sob a forma de Análise SWOT. Esta consiste numa análise integrada dos fatores internos e externos aos estágios, e de como estes foram percecionados. Desta forma, as experiências são descritas com base numa correlação entre forças, fraquezas, oportunidades e ameaças.

O estágio nos Serviços Farmacêuticos da Unidade Local de Saúde de Castelo Branco permitiu o contato com o hospital, os circuitos do medicamento e a especialidade farmacêutica.

O estágio na Farmácia Nuno Álvares possibilitou uma experiência de farmácia comunitária. Proporcionou, igualmente, aprendizagens quanto ao papel do farmacêutico, o contato com os utentes, e o modo de funcionamento de uma farmácia.

Palavras chave: Malária, Malária Cerebral, *Poupartia borbonica*, Poupartone B, Lipossomas, Análise SWOT.

Abstract

This report presents the work carried out at the University of Liège, in Belgium, through the ERASMUS + program. It consisted of continuing the research on compounds with anti-plasmodial activity, namely, the Poupartone B compound extracted from *Poupartia borbonica*, a plant endemic to the Mascarene Islands. This compound is the second of its family of compounds to be studied for a possible application in the treatment of cerebral malaria. The experimental work consisted of several research stages: extraction, isolation and purification of the compounds, construction of liposomes, validation and evaluation of the formula's stability, heparin quantification, toxicity studies in a zebrafish model and efficacy tests in *in vitro* *P. falciparum* strains. In the process, new compounds were discovered and simultaneously investigated. The validation and stability were successfully demonstrated and the applicability of the formulation was assessed. The newly discovered compounds proved to have no action against the parasite, however, the formulation with Poupartone B managed to significantly reduce the toxicity when compared to the compound alone, as well as augment the efficacy against the parasite *in vitro*, allowing the follow up of the investigation to *in vivo* tests.

The internship's reports are written in SWOT analysis. This form of analysis consists of an integrated analysis of the external and internal factors that influence the internships and how they were perceived. This way, the experiences are described through means of a correlation between strengths, weaknesses, opportunities and threats.

The internship at the Pharmaceutical Services of the Castelo Branco Local Health Unit allowed contacting with the hospital, the medicines' circuits and the pharmaceutical specialty.

The internship at the Nuno Álvares Pharmacy allowed experiencing in community pharmacy. It enabled the learning process about the pharmacist's role, how to contact with patients and how a pharmacy works.

Key-words: Malaria, Cerebral Malaria, *Poupartia borbonica*, Poupartone B, Liposome, SWOT Annalysis.

Lista de Abreviaturas

ACT – Artemisinin-based Combination Therapy

ALT – Alanina Aminotransferase

ARSCentro – Administração Regional de Saúde do Centro

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

AUE – Autorização de Utilização Especial

BBB – Brain Blood Barrier

CFT – Comissão de Farmácia e Terapêutica

CM – Cerebral Malaria

DCI – Denominação Comum Internacional

DGS – Direção Geral de Saúde

DIDDU – Dose Individual Diária em Dose Unitária

DL₅₀ – Dose Letal, 50%

DMSO - Dimethyl Sulfoxide

DOPC - 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

EPE – Entidades Públicas Empresariais

FC – Farmácia Comunitária

HIS – Host Immune/Immunity System

HIV/SIDA – Human Immunodeficiency Virus/Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

HPLC – High Pressure Liquid Chromatography

IC₅₀ – Inhibitory Concentration, 50%

ICAM-I - Intercellular Adhesion Molecule I

IMC – Índice de Massa Corporal

INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

IV – Intravascular

LASA – Look Alike Sound Alike

LC-MS - Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

NMR – Nuclear Magnetic Resonance

PDI - Polydispersion Index

PEG - Polyethylene Glycol

PfEMP - *Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membrane Protein

PfHRP2 - *Plasmodium falciparum* Histidine-Rich Protein 2

pRBC – parasitized Red Blood Cell

RAM – Reação Adversa Medicamentosa

RBC – Red Blood Cell

RCM – Resumo das Características do Medicamento

Rf – Retention factor

SNS – Sistema Nacional de Saúde

SF – Serviços Farmacêuticos

TDT – Técnico de Diagnóstico e Terapêutica

TLC – Thin-Layer Chromatography

ULS – Unidade Local de Saúde

ULSCB – Unidade Local de Saúde de Castelo Branco

WHO – World Health Organization

I. Monografia – Evaluation of the activity of new alkyl cyclohexenones of *Poupartia borbonica* on *Plasmodium falciparum*

Avaliação da atividade de novas alquil-ciclohexenonas de *Poupartia borbonica* sobre *Plasmodium falciparum*



1.1. Introduction

Malaria is a parasitic disease that is thought to exist since, at least, 3200 BC.¹ It was referenced by Greeks in 850 BC and more recently identified on Egyptian mummies, such as the pharaoh Tutankhamun, who lived circa 1550-1070 BC.^{2,3} Even though the Greeks characterized the fevers, only centuries later, in 1880, did Charles Laveran visualize and report the cause of the disease: a parasite in the blood. Afterwards, a couple more years were needed until, in 1898, Grassi, Bignami and Bastienelli demonstrated that mosquitoes were responsible for the transmission. They elucidated the life cycle of the organism and proved that only the female *Anopheles sp.* could transmit the disease.³ To complete the life cycle, scientists needed to understand what happened since the moment of the mosquito bite until the blood stages, correctly identified as the source of the fevers. It was only in 1947 that Henry Chortt and Cyril Garnham showed there was a liver phase in that interval, thus completing the cycle.³

Nowadays, through the advancement of scientific technology and knowledge, we have a more thorough understanding of this disease, that is endemic to 91 countries in the world.⁴ There are 120 different species of *Plasmodium sp.*, a protozoan parasite, of which four prominently infect humans: *Plasmodium malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* and *P. falciparum*.⁵ Of the four, the *P. vivax* and the *P. falciparum* are the most prevalent and mortal. *P. falciparum* is accounted for 99% of the total global deaths related to malaria, estimated 429 000 deaths in 2015, from which 70% were children under the age of five.⁴ The prevalence of the disease, although successfully decreasing throughout the years, is still estimated to have affected 114 million people in 2015 in the sub-Saharan Africa alone.⁴ In the endemic areas, the most susceptible population are children under the age of five and pregnant women. The high rate of transmission in these areas allows older subjects to develop a degree of immune protection, while the immaturity of the immune system in children makes them more vulnerable to the severity of the disease and to co-infections. In women, pregnancy might reduce the immunity to malaria, making them more vulnerable to the effects of the disease. Furthermore, the disease increases the risk of spontaneous abortion, stillbirth, premature delivery and low birth weight, which in turn contribute to high children mortality.^{4,6}

It could be expected that, with the scientific advancement and understanding of the disease, these numbers would presently be lower, but the lack of awareness of the symptoms in affected areas, the cost of the treatments and difficult access to healthcare providers might justify the prevalence and mortality of this disease.⁴ Consequently, the

objective of this work is to target it, more particularly *P. falciparum* and one of its documented complications – cerebral malaria.

1.1.1. Biology of *P. falciparum* and Malaria Disease

The disease debuts when the sporozoites invade the skin through the bite of the female *Anophelles sp.* mosquito and migrate towards the liver, where they invade the hepatocytes, forming a parasitophorous vacuole. The parasite establishes a connection to a specific lipoprotein receptor in these cells that mediates cholesterol levels. Cholesterol is thought to be needed for the parasites to grow rapidly.⁷ In fact, after 2-10 days of intense multiplication, the hepatocytes start to detach from the liver and to release mobile merozoites into vesicles, called merosomes, into the bloodstream.⁸ At this stage, the invasion of the RBC by the merozoite occurs, it lasts about two minutes and involves a connection to specific membrane proteins and deformation of the RBC, with reorientation of the parasite so that the apical extremity can attach to the RBC membrane. From here, within the next 48 hours there will be schizogony accompanied by the formation of 16-31 merozoites that will egress from the RBC, destroying it in the process and causing the clinical manifestation of the disease. This way, the new infecting forms are in contact with new RBC and can restart the erythrocytic cycle. This process is tightly regulated so that it can occur simultaneously, possibly by several protein kinases.⁶ In this schizogony stage, some merozoites will initiate their differentiation into sexual gametes by a process that is not yet fully elucidated. It is possible that the shift to this cycle ensues through external stimuli that the parasites are able to recognize, perhaps through highly immunogenic vesicles released by pRBC, that are uptaken by other pRBC, and, therefore, provoke the rise in the gamete count in the bloodstream.^{11,12}

Once installed in the vacuole inside the RBC, the parasite transforms this differentiated, but anucleated and with few organelles, cell into one that can protect it from the HIS and that works for its own growth.^{6,10,13} This process occurs through the production and transportation of several proteins expressed by the parasite. The parasite develops an acidic digestive vacuole where it degrades the RBC's hemoglobin by proteases and uses the subsequent amino-acids to produce other proteins. Haematin is a by-product of this reaction and is sequestered into a crystalline form, the malaria pigment (haemozoin), which stays inside the vacuole in a stage that functions as a detoxification mechanism.¹³ The most studied family of important parasitic proteins is *P. falciparum* erythrocyte membrane proteins I (PfEMP1) that function as adhesins. These proteins that are transported to the pRBC's membrane, allowing it to adhere to the blood vessels of numerous organs with selectivity,

like the brain or the placenta, consequently avoiding the splenic clearance and removal. The adherence capability distinguishes *P. falciparum* from the other *Plasmodium sp.* that ail humans and is responsible for the severity of the disease and mortality rates through complications, e.g., in pregnancy when attached to the placenta, and cerebral malaria when to the brain, which we will deepen ahead.^{6,13-15} These proteins are exposed to the HIS, however the parasite can alter their expression to evade this system.¹⁴ This capacity is thought to allow *P. falciparum* to maintain a chronic infection.⁶

The sexual gametes, once formed, flow in the blood to the peripheral blood vessels, where they can infect a new female *Anophelles sp.* mosquito when it takes a blood meal, continuing the life cycle to the sexual cycle in its gut cells. The new-formed mobile sporozoites migrate to the insect's salivary glands where they are ready to infect or re-infect a human being with a bite.⁶

The disease *per se* is complex and can be asymptomatic or symptomatic. In a naive patient, the most common symptom is the recurrent fever. Other symptoms are less specific and include head and muscle ache, fatigue, chills and perspiration. The symptoms are also not very specific in children, with lethargy in addition to the others.¹⁶ The severe stages are reached when there's life-threatening anemia, metabolic acidosis, cerebral malaria or multiorgan system involvement.¹⁷ If diagnosed correctly and if effective antimalarial treatment is administered, a full recovery is expected. If the treatment is delayed or ineffective, particularly in *P. falciparum* infection, the disease can evolve to lethal severe malaria, especially in the most vulnerable groups such as children, pregnant women or travelers. Hence the importance of carefully dealing with suspected malaria patients. The WHO advises that a parasitological test should be carried out (microscopic or rapid diagnostic test), in all cases of suspicion, to confirm the diagnosis, before administering drugs, to prevent overtreatment, drug resistance and better distinguish other febrile diseases.¹⁶

The immunity concept in malaria disease was concretely proved by Coggeshall and Kumm in 1937 when they demonstrated the passive transfer of malarial immunity in rhesus monkeys.¹⁸ In fact, the prevalence of the disease is lower in babies until two to three months old and afterwards increases greatly in children, which is compatible with the idea that protective antibodies are passed to the baby by the mother after birth.¹⁸ When these antibodies disappear, the child becomes highly vulnerable to the disease, hence the fact that children under 5 years suffer more recurrently and severely. While the child grows and is successively exposed to different types of variant antigens, antibodies are produced as they

are needed.¹⁹ In adulthood, it is rare for a local to an endemic place to show the acute form of the disease, as he already has a stock of protective antibodies gathered throughout his life.^{4,6,16,18,19} Therefore, it is difficult to build a vaccine for malaria. Because the parasite has poor antigenicity, the molecules between different strains diverge greatly and the parasite can adapt its antigen expression, the immune system is exposed to so many antigens that it must adapt to, that only in late years it has built a repertoire to confer a good level of protection, after recurrent and intense exposure.^{6,13,18} Still, a lot of research is employed into trying to develop a vaccine, especially for children, to minimize the severity of the disease. A vaccine that targets the blood stages could diminish the parasitemia and adherence, thus accomplishing this.¹⁵ To this end, the WHO recently approved the RTS,S vaccine, a sporozoite vaccine active against *P. falciparum*, for a pilot vaccination program in 2018 after the last phase III studies in 7 countries in sub-Saharan Africa accomplished a partial protection (30-50%) in children aged 5-17 months. This vaccine was developed especially for children and only as a complement to the advised prophylaxis, diagnosis and treatments.^{6,20,21}

Contrary to other species, such as *P. ovale* and *P. vivax*, *P. falciparum* can't stay latent in the patient's body, thus when treating a *P. falciparum* identified patient, the disease is cured. Cured is defined by WHO as "elimination of all parasites from the body".¹⁶ If the symptoms resurge it might mean the treatment wasn't completely carried out, or the parasite is resistant to the drugs or there was re-infection.⁶ It is advised to assess the parasite genotype and compare it with the one from the previous infection.¹⁶

1.1.2. Cerebral malaria

Cerebral malaria is a manifestation of severe malaria by *P. falciparum*. It is characterized by psychic symptoms and affects children and pregnant women in their second and third trimesters the most.^{13,16,22} If untreated, its mortality reaches almost 100%, although with medical care the mortality is around 10-20%.¹⁶ Care should be given immediately upon arrival to the healthcare facility since most deaths in these cases occur in the first 24h of admission.^{16,23-25} In severe malaria, the risk of death increases with the existence of multiple complications and in CM, particularly, more than one indicator is normally present, such as impaired consciousness or coma, hypoglycemia, multiple convulsions and severe anemia, among others.^{15-17,22,24} CM is diagnosed when these symptoms are present in the absence of an alternative cause and *P. falciparum* asexual parasitemia is identified in the peripheral blood.^{16,22-24} The presence of a high parasitic mass suggests that the mature parasitic forms are freely reproducing, mediating the infection process and taking enormous amounts of systemic glucose, responsible for the pathogenesis of hypoglycemia that provokes the worst

outcome in children. Likewise, the more pRBC, the more RBCs die each cycle, contributing further to a severe anemia and to the severity of the disease.^{14,15,17,22}

One of the characteristic CM's mechanisms is the sequestration. As mentioned before, *P. falciparum* pRBC express a membrane protein, PfEMP1, that enables the pRBC to adhere to endothelium receptors. This process allows the parasites to evade the HIS and spleen elimination. Also, as the pRBC don't show in the peripheral parasitemia, sometimes the measured parasitemia is underestimated. When it occurs in the brain, however, the situation leads to further complications. The high mass of parasites in the brain largely consume the glucose available and eventually form a clog in the brain blood vessels responsible for hypoxia and the subsequent complications, such as unconsciousness, convulsions or coma.^{6,14,15,17,26-29} Actually, recent evidence suggests that cerebral malaria patients parasite's preferentially bind to vascular endothelium than patients with other forms of severe malaria.^{15,27} This sequestration leads to acidosis and respiratory distress, which together with neurological involvement, prove to be important bedside symptoms that can indicate severe malaria.²³

Other mechanisms are thought to be involved in CM's pathology. One is the extensive host immune response. It augments the production of tumor necrosis factor- α , interleukin 6 and I and diminishes de nitric oxide availability and, thus, sets an inflammatory chain. This process activates the endothelial tissue, e.g. in the brain, deregulating it and causing more adherence receptors, ICAM-I for example, to be available to connect to the PfEMP on the pRBCs surfaces. Also, the high parasitic mass implies a great number of pRBC turnover, which contributes to the liberation of RBC's components that act as pro-inflammatory cytokines, such as hemoglobin, which further enhance the inflammatory response of the host.^{14,15,22} This endothelial deregulation affects the BBB, that loses its integrity at the same time the blood flow and coagulation are altered.^{14,15,17,24} All these pathways may culminate in an increased brain volume that leads to the raise of intracranial pressure and its complications (herniation, impaired cerebral blood flow) that contribute to fatal outcomes, particularly seen in African children.^{22,26,30} However, the increase in brain volume is not universal and intracranial pressure is not elevated in adults. There are several thought reasons for this, such as seizures being more frequent in children, different HIS reaction, changes in the vascular system age-accordingly, BBB maturity, different binding capability and other pathologies involved.^{17,26} Still, the neuropathology has been linked with ring hemorrhages in both children and adults, and these are possibly caused by thrombosis.¹⁷ This variability demonstrates that CM is not histologically uniform, that there are multiple

pathological mechanisms that induce disease and death and that these are not completely understood yet. This presents a difficulty in the diagnosis and in assigning the right treatment to the right clinical condition.

As such, it is important to perform a differential diagnosis upon the admission of the patients to the hospital. The main symptoms associated with cerebral malaria, coma and fever, are also indicative of a meningoencephalitis and in such cases a lumbar puncture is necessary to distinguish between the two. Also, considerable clinical overlap exists between severe malaria, septicemia and pneumonia. These conditions can coexist or exist separately, further analysis should be done to assert which is the case.¹⁶ One way to differentiate who needs antimalarial treatment or antibiotic treatment is through the quantification of PfHRP2, a receptor expressed on the surface of the pRBC, that can reveal more accurately the presence of *P. falciparum* and the need for specific treatment.^{31,32}

About 5% of the children with CM remain handicapped, which still represents significant residual morbidity.²⁴ Neurological sequelae are associated with convulsions, prolonged coma and severe anemia and can be subtle or include intellectual impairment. Although the recovery of children and adults with CM is eased with adequate care, the possibility of neurological damage can't be overlooked, especially in children.^{22,24-26}

1.1.3. Treatment of Malaria

The WHO's intervention began in 1955 with the Global Malaria Eradication campaign, which advised the use of chloroquine and insecticide DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) indoors to intersect malaria transmission. The appearance of resistance to dieldrin (insecticide) by the mosquito and to chloroquine by the parasite, later in the 1960's, forced the organization to alter its approach.^{10,21,33} In fact, the irrational and indiscriminate use of antimalarial drugs without the proper diagnosis, dosage or limit enabled this highly variable parasite to adapt to the present-day medicine.¹⁶ Resistance, in this case, is the ability of a parasite's strain to survive or thrive despite the presence of antimalarial drugs in the recommended dose or higher. This resistance arises due to selective pressure and spontaneous mutations.^{21,34} The mutations occur spontaneously when a new mutation gives the parasite a survival advantage against drugs, and through selective pressure: when exposed to the drugs, the parasites that have a genetic change that will allow them to survive multiply rapidly, while the others that don't change, die. These resistant parasites follow their natural cycle and eventually, through transmission to the mosquito, spread the resistance.

To counter this process, in 2001, WHO officially recommended the use of artemisinin combination therapies (ACTs) as the first-line of treatment of *P. falciparum*, i.e., all cases of malaria should be treated with at least two antimalarial medications with different mechanisms of action and with the appropriate weigh-based dosing.^{16,21,33} The ACT is composed by artemisinin derivatives, fast acting, effective and also active against the sexual stages, preventing therefore the transmission, and a longer-acting drug that eliminates the parasites that might be resistant to the artemisinin derivative, having a prophylactic effect. Presently, the latest treatment guidelines from 2015 published by the WHO recognize that it is essential to delay and to try to prevent resistance to drugs to augment their useful therapeutic life and, to that end, the organization continues to recommend the ACT.

Despite the global efforts of the last decades, resistance has been reported for all classes of antimalarial drugs, including artemisinin derivatives.^{13,16,21} Studies have been carried out for several years to elucidate the mechanisms of resistance of *P. falciparum*. The chloroquine resistance mechanism is thought to arise from mutations in a digestive vacuole membrane transporter that exports the drug out of the vacuole, its site of action where it would bind haematin, preventing it from crystalizing into haemozoin and, therefore, preventing detoxification.¹³ In the same manner, changes in drug accumulation or efflux mechanisms also apply to amodiaquine, quinine, halofantrine and mefloquine.²¹ The artemisinin resistance mechanism is surrounded with more controversy because its mechanism of action is not completely established. It could be that it is activated by iron-containing compounds produced in the digestion of hemoglobin.¹³ This mechanism is thought to, similarly to pyrimethamine, cycloguanil, sulphonamide and atovaquone, be related to point mutations that alter the target's affinity to the drug.²¹ WHO states that the resistance to artemisinin is partial and affects only ring-stage parasites so far.³⁴

The problematic of the acquirement of resistances is that it can lead to cross-resistance, when the resistance is effective in molecules of the same chemical family or with the same mechanism of action.²¹ Also, the prevalence of resistance, specially to the artemisinin derivatives, is prejudicial because it augments the exposure of the parasite to the partner drug, increasing its selective pressure and enabling new resistances to emerge. It also compromises the treatment of severe malaria. Currently, ACT treatment is still recommended when there is resistance to the artemisinin derivative, if the parasite is not resistant to the partner drug. The WHO refers that this artemisinin resistance translates in delayed parasite clearance when using ACT, which doesn't necessarily mean the treatment will fail.³⁴ However, resistance to some ACTs has already emerged in the Greater Mekong

sub region and is reportedly leading to therapy failure.³⁴ The WHO currently recommends monitoring the first and second-line ACTs every 2 years in all falciparum-endemic countries to assess their efficacy and take further measures when resistance is suspected or emerges.³⁴ This is important, because if resistance to most of these combinations rises, it could initiate an epidemic outbreak of malaria.²¹

Considering WHO's referred ideals, it would seem likely that the discovery of a new compound with a different action mechanism could prove invaluable in the fight against malaria and its resistance development. A new molecular structure with good antimalarial activity, used correctly in combination therapies, could keep in check the evolution of resistance in this parasite and augment the therapeutic life of other drugs in places where resistance to them hasn't emerged yet. These new compounds could emerge from previously known molecules, for which their antiplasmodial activity has not been screened yet, or from natural organisms, which currently are assumed to have a big potential in aiding modern medicine with old issues through their recent chemical characterization. Similarly to artemisinin that is obtained from *Artemisia annua* and used in China since many centuries ago, plants still have a lot of new compounds left to be discovered and that can have important pharmacological applications.³⁵⁻³⁸ The objective of the research with plants in this disease would be to find a compound with similar efficacy to existent drugs, low toxicity, and that could be easily administered.

1.1.4. The plant: *Poupartia borbonica*

Poupartia borbonica is a critically endangered species endemic from the Mascarene Islands, namely Réunion, Mauritius and Madagascar.^{39,40} Locally known as “bois-blanc rouge”, “Zevi-marron” and “bois-de-Poupart”, it was first identified 1791, named as *Spondias borbonica* in 1877, and only recently changed to its current name.^{40,41} It is a tree from the Anacardiaceae family and it can be found on semi-dry forests of these islands. The human invasion and destruction of the forests for agriculture and the voluntary or involuntary introduction of new species eliminated most of the natural habitats of this plant. Also, the regeneration tax of this species is low and as such, the known number of plants is low. Consequently, a national action plan was enabled to try to protect it from extinction.⁴⁰ Anatomically, this is a tree that can reach 15-20 m of height, its trunk grows straight, with until 70 cm of diameter, and its bark is brownish to reddish with a red sap. Its leaves undergo a maturity process, from juvenile, to two stages of transition, to adults, which are grouped in the extremity of the branches in pairs of 3 to 5. They are 20-25 cm long, ovals, with orange nervures and a light green limb. This tree's male flower is dark purple with 5

mm diameter and the female flowers are also dark purple with 4 mm diameter. Its fruit consists of a purplish 1,5 cm diameter drupe, often with only one seed with an irregular shape – see Anexo I.⁴⁰

Its traditional usage was reported in 1895 by Jacob de Cordemoy when he stated that the decoction of the bark of this tree was used to render the women infertile.⁴⁰ In the XIX century other traditional usages were identified. Through the decoction or infusion of the bark, alone or in association with other plants, one could resolve kidney complications, blood problems or fight asthma.^{40,42} Still today, the locals explore the bark of this tree for its believed medicinal properties, which is thought to be one of the reasons why it is endangered today.⁴⁰ Apart from the descriptions of Lavergne and Véra on the traditional use of plants in medicine in the local communities, the pharmacological properties of this tree have not yet been assessed fully. There were studies which identified the diuretic and potential anti-hypertension properties of this plant through its bark extract's ability to inhibit the angiotensin-I-converting enzyme, which revealed an inhibition of 84% and higher, depending on the extract.^{43,44} However, further studies on its chemical compounds and possible activities were yet to be performed.

The Reunion Island, from which this plant originates, is an oceanic island of volcanic origin that has never been connected to a continent. Therefore, the flora is characterized with a high percentage of endemic species.⁴³ Because these species are unique, so can their properties be, if studied. With that in mind, the European Fund for Regional Development (FEDER) developed the BioMoITCN project: several different universities evaluate the properties of the referred endemic species in several areas, such as anti-viral, anti-fungal, anticancer, anti-bacterial and anti-free radicals, cytotoxic and anti-parasitic, which is the part of the project assigned to this laboratory team. Numerous samples from diverse life forms were sent from the University of Reunion and analyzed for their antiplasmodial potential. In this initial screening, *Poupartia borbonica*'s crude extract excelled others with the lowest inhibitory concentration. Particularly the leaf's extract presented a better activity than the bark extract.

Because this plant had not been profoundly studied, there was little information about its chemical constituents. To further understand the leaf's activity, first it had to be characterized. This work was done previously by this laboratory team.⁴⁵ They discovered that the ethyl acetate (EA) extract had the highest antiplasmodial activity, so it was studied further to identify and isolate the active compounds. It was fractioned by liquid

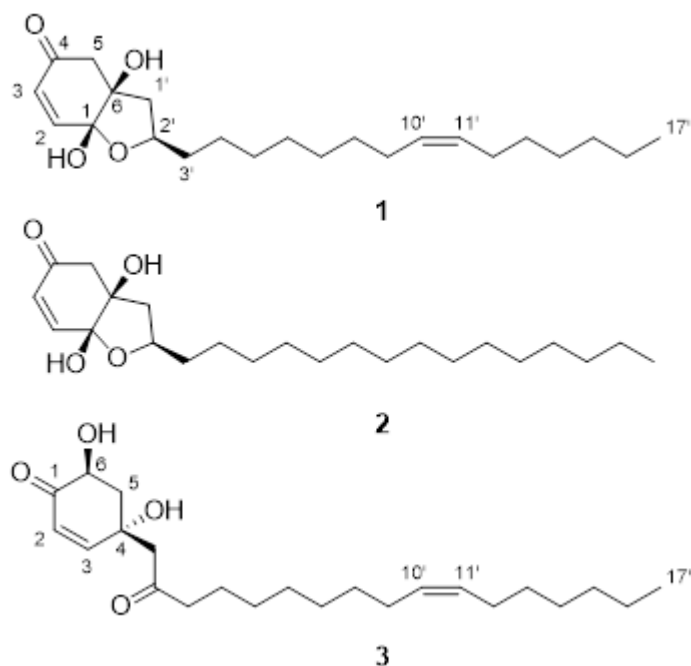


Figure 1 - The three cyclohexenone derivatives. Compound 1 is defined as (2R,3aR,7aR)-2-[(Z)-pentadec-8-en-1-yl]-3a,7a-dihydroxy-2,3,3a,7^a-tetrahydrobenzofuran-5(4H)-one and named Poupartone A. Compound 2 is defined as (2R,3aR,7aR)-2-pentadecyl-3a,7a-dihydroxy-2,3,3a,7a-tetrahydrobenzofuran-5(4H)-one and named Poupartone B. Compound 3 is defined as (4S,6R)-4,6-dihydroxy-4-[(Z)-2-oxoheptadec-10-en-yl]-cyclohexen-2-enone and named Poupartone C. Reference: Ledoux., A.⁴⁵

chromatography through a silica packed open column and its activity evaluated. After further separations and purification by preparative HPLC, three abundant compounds, responsible for about 50% of the EA extract activity were identified.⁴⁵ Its molecular structures were assessed through ¹H NMR and LC-MS analysis and proved to be alkyl cyclohexenone derivatives, a new structure presented in Figure 1. Other molecules with a conjugated cetone were reported in literature for their antiplasmodial activity and cytotoxicity, giving an additional motivation for the investigation of these three new cyclohexenone derivatives.⁴⁶

These molecules were evaluated in *in vitro* tests for their antiplasmodial and cytotoxic activities. Although their activity was significant and superior to the EA extract, their cytotoxicity was also noteworthy, with no hemolysis. The Poupartone A was the most plentiful, active and cytotoxic and its activity was further investigated *in vivo*. Despite being able to reduce the parasitemia 69.5% by day seven, after that day the mice started to die. To understand this toxicity, an essay on zebrafish larvae was performed. From this test, it was determined cumulative toxicity, suggesting cardiac toxicity in concentrations of 2-2.5 µg/ml. These tests account for a possible mechanism of toxicity in mice, since their heart features are similar.⁴⁷ After these tests, Poupartone B was investigated since it has a similar activity

but slightly lower toxicity to Poupartone A. Furthermore, a new formulation was developed to try to reduce the toxicity.

1.1.5. The strategy: the formulation

The high toxicity of the compounds of interest might jeopardize their potential as new antimalarial drugs. Consequently, a new formulation was developed. Even though the exact mechanism is not known, there is enough evidence in the literature to support the application of a liposome's model with the finality of diminishing the compound's toxicity.⁴⁸ Liposomes were described in 1960s after the hydrophobic effect was observed: when lipids were in contact with water, they would rearrange themselves to have as less contact with the water molecules as possible, forming layers, micelles or vesicles.^{49,50} Liposomes are bi-layered vesicles built from phospholipids, amphipathic molecules also present in cell membranes, that form an internal hydrophilic environment capable of carrying aqueous molecules.⁴⁸⁻⁵³ They can also incorporate lipophilic molecules in their lipid membrane, giving them the versatility needed to carry various compounds, specially extracted from plants.^{52,54} They can be built from natural lipids, occurring in nature, biodegradable and biocompatible, making them optimal drug carriers when concerning safety, or from synthetic lipids.^{50,52-54} They are recognized *in vivo* by the reticuloendothelial system and metabolized and eliminated by the liver or the spleen, more or less fast depending on their physico-chemical characteristics.^{50,52}

The liposomes can be classified by their preparation method, size and lamellarity. These last are influenced by the method used, the lipids, the temperature and presence of other molecules.^{50,51} There are several preparation methods that vary with the pretended final product. The choice is based on several factors, such as the characteristics of the liposome's components and of the molecule to encapsulate, the size and half-time desired and the cost, reproducibility and large-scale transposition capability.⁵⁰ Examples of preparation methods are: thin-film hydration method, reverse-phase evaporation and solvent-injection methods, detergent-depletion method, the microfluidic-based method and other industrial-scale methods: heating method, spray-drying, freeze-drying, supercritical reverse-phase evaporation and several modified ethanol-injection techniques.⁵⁰ The size of the vesicles is important because it influences the liposomes interaction with the organism *in vivo*, including their elimination. If smaller than 50 nm they can penetrate random blood vessels and have small encapsulation efficiency, and if bigger than 450 nm they are rapidly eliminated from the blood by the reticuloendothelial system and, thus, have a short half-life. Hence, the size of liposomes used in medicine range from 50 to 450 nm, though otherwise

they can range to 1 μm .^{50-53,55} Concerning lamellarity, depending on the preparation method, the liposome can have one or multiple layers. A liposome with one layer is unilamellar and has a bigger internal aqueous core, so it carries hydrophilic compounds better than a vesicle with several layers that has a smaller aqueous core and, thus, accomplishes better encapsulation with lipophilic molecules.^{50,52}

To adapt this system to drug delivery, second-generation liposomes were formed around the 1990s, where size, charge, encapsulation capacity and surface composition were altered to optimize their activity. One of the major strategies implemented was the PEGylation of the liposome surface to improve its stability and half-life in the bloodstream.^{50,52-55} Other methods to adapt the liposomes were also demonstrated. To accomplish an ideal size, after the liposomes are built, a processing step is necessary. Methods such as sonication, applying ultrasonic irradiation, or extrusion, filtration through a membrane with a defined pore size, may be applied.⁵⁰ The charge is also an important parameter because it influences how the liposome will interact with other molecules and cells, influencing the extent of the drug delivery. Liposomes can interact with the cell membrane, releasing the compound inside the cell or in the extracellular mean, or be up-taken whole by endocytosis, through various means, depending on their charge.^{50,54} Liposomes can be charged negatively, positively or be neutral. If neutral, the aggregation increases because it's their charge density, positive or negative, that prevents aggregation and flocculation through repulsion. If negative, it has been shown that the vesicles are less stable and are more rapidly eliminated. The most studied and used are the cationic liposomes. They can bind negatively-charged molecules, such as DNA, and they seem to be preferably up-taken by target cells for being more attracted to the negatively-charged cell membrane, improving the cellular concentration of the molecule of interest.^{50,54} Being positively charged is also an important parameter to cross the BBB and deliver compounds in the brain. This is thought to be accomplished through the interaction with the negatively-charged receptors in this barrier.^{50,51,56} The encapsulation capacity is also a very important parameter, it's defined by the liposomes capability of trapping the compound of interest and it's evaluated through the encapsulation efficiency. This process depends on how the lipid layers interact with the compound, which is dependent on the molecule's polarity and partition coefficient.⁵⁰ If the molecule is hydrophilic it is expected to be in the aqueous core and, if lipophilic, it is expected to be in the alkyl hydrocarbon chains of the phospholipids. This interaction also influences the rate of delivery.⁵⁰ Lastly, the modification of the surface of the vesicle can accomplish several advantages, such as improved stability and half-life. An example of a modification to the

surface is the addition of cholesterol, a non-toxic natural-occurring steroid, that is added to the liposome's layer to reduce its permeability and increase its *in vitro* and *in vivo* stability. The presence of cholesterol promotes a dense packing of the phospholipids, which translates in a longer retention of the molecule inside the liposome, and inhibits the uptake of lipids of the vesicle by the high-density lipoproteins (HDL) and low-density lipoproteins (LDL), improving their stability in the blood stream.⁵⁰ The surface manipulation also allows specific targeting to tissues and cells, contrary to the conventional liposomes that act through passive targeting. This way, the required dose is diminished and the expected toxicity is smaller.^{50,52,54} Through these modifications, the behavior of the liposome, and consequently of the trapped compound, can be optimized to specific delivery, half-life and elimination. Consequently, they are currently a preferred microcarrier for drug delivery.

Several methods are available to characterize and assess a liposome's stability and quality based on these factors that influence its behavior *in vitro* and *in vivo*.^{50,54} Shape can be seen through electron microscopy and lamellarity through transmission electron microscopy, for example. Size and size distribution, or polydispersion index, can be evaluated through dynamic light scattering (DLS), for instance. The liposomes in a suspension collide with each other and with solvent molecules and because of that, they undergo random Brownian movements, which in turn scatter the light and make its perceived intensity fluctuate in a time-dependent manner that, through well-established theories, is converted into a size distribution.⁵⁰ Charge is also assessed through DLS using a zeta-potential analyzer.⁵⁴ The surface composition is harder to assess, it depends on what molecules are added and their characteristics.

Presently, liposomes have also been reported to deliver drugs to the brain, which is the final destiny of this compound of interest. By adapting the size and charge and adding targeting molecules it is possible to direct these vesicles to the brain by by-passing the BBB.⁵¹ But more interestingly, administration of liposomes through the intranasal mucosa also accomplishes this delivery.^{25,28,29,56-60} In fact, intranasal delivery has characteristics that make it one of the best administration routes: a large surface area for drug absorption that is highly irrigated, direct passage to blood, thus avoiding the first-pass metabolism in the liver, quicker onset, fewer side effects, easy accessibility and non-invasive.^{25,28,56-59} Other administration ways pose problems in CM: IV administration must be performed by a qualified person with specific skills and with specific materials, which sometimes are lacking in endemic countries, oral administration, in cases of CM, is not an option in some cases due the lack of consciousness of the patient, occurrence of convulsions or vomiting.²⁵ Therefore, the nose-

to-brain approach is one of the most viable to use in endemic countries in people with CM. Studies in mice report the relevant efficacy of intranasal administered malaria therapies in severe malaria models, which further supports the presented idea.^{25,28} It is thought the liposomes can reach the brain through two mechanisms: intracellular uptake, passing directly through the mucosa cells by endocytosis, and extracellularly, alongside the olfactory trigeminal nerve system that originates in the olfactory bulb.⁵⁷⁻⁵⁹ Reaching the olfactory bulb is important, since it is thought to be where the first symptoms of CM appear in mice, besides being a direct pathway to the brain.²⁹ This way, the liposomes can protect the compound from degradation by the mucociliary clearance system of the nose and augment the dose that reaches the brain.⁵⁸

To optimize the activity of Poupartone B and to further diminish its toxicity, targeting was imperative. Targeting in this case would allow the compound to be delivered only to pRBC, possibly by-passing its toxicity. To this end, heparin was added to the liposome's surface through an electrostatic mechanism. Heparin is a negatively-charged glycosaminoglycan highly sulfated and naturally present in mast cells that can be used as a biopolymer on the surface of liposomes.^{53,55,61,62} Heparin has several demonstrated activities, like inhibiting the PfEMPI in merozoite invasion and disrupting rosettes and endothelial-binding of pRBC.^{12,61-64} Also, when on the surface of liposomes, it improves the stability, half-life and haemocompatibility. Its ability to target preferentially pRBC than normal RBC while possessing antimalarial activity by itself, in non-anticoagulation concentrations, presents this approach as a two-in-one opportunity to improve the efficiency of this formulation.^{61,65}

1.1.6. Current study

In this study, several elements had to come together to accomplish the experiment's goal: to access the possibility and efficacy of Poupartone B in CM in mice. In order to achieve this, a formulation had to be constructed with the elements that would most likely make the administration of the compound to the mice's brain possible without harmful effects. And so, as the liposomes reveal themselves as safe versatile nanocarriers that can deliver complex molecules to certain tissues and in small dosages, the vehicle was elected. The composition of the vesicle was chosen carefully after reviewing the existing literature and was set as a double layered liposome built with DOPC, a phospholipid, DOTAP, a positive lipid acting as an anchor to heparin, our deliverer, and cholesterol. A perceived final structure of the formulation is described in Figure 2. The liposomes were built through hydration of the lipidic film and afterwards accessed for quality, as the optimization was done previously. The validation of the encapsulation efficiency and the quantification of heparin on the surface

were also relevant factors to ensure the feasibility of the *in vivo* tests with this formulation. In the same way, stability essays were necessary to evaluate the viability of the formulation through time. Finally, efficacy tests were important to provide evidence of the effects in life organisms: the toxicity tests in a zebrafish model, *in vitro* tests in *P. falciparum* strains and lastly, not featured in this paper, *in vivo* tests in mice.

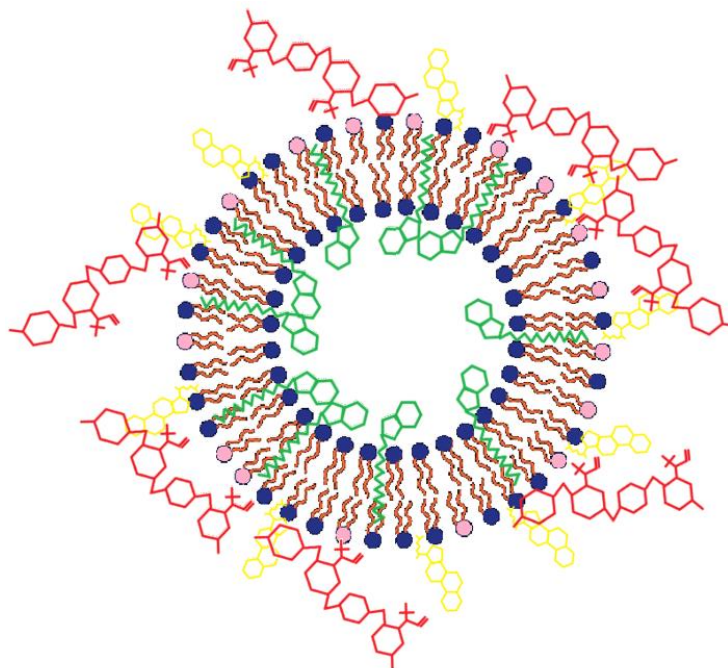


Figure 2 - Model of the liposomal structure. In brown and blue the phospholipids, in pink the DOTAP, in green the Poupartone B, in yellow the cholesterol and in red the heparin. The liposome might have multiple layers like this one.

1.2. Materials and Methods

1. Extraction of the leaves and the isolation and purification of active compounds

1.1. Liquid-Liquid Extraction – 1g of dried EA extract resultant from the macerate extraction of the leaves was defatted through an extraction in a two-phase solvent system with *n*-hexane/methanol/acetonitrile (6:0,5:3,5).

1.2. Preparative HPLC – The resultant aqueous phase was analyzed in a C₁₈ column using a Varian ProStar chromatography system holding a diode array detector with a Büchi Fraction Collector C-660. The system was washed 20 minutes with methanol. The run's flow rate was 30 ml/min with a binary solvent system, 0.1% acid formic solution (in Milli-Q water) and methanol, in a continuous gradient from 40:60 to 0:100 for 30 minutes. 1g of product from the evaporated aqueous EA extract was analyzed each time after being dissolved in 5 ml of methanol with the aid of ultrasounds. The solution was filtered in a syringe with a 0,45 µm filter and the solution injected in the system, usually between 3 and 4 ml. The UV detector detected at 254 nm and the major compounds of the solution were collected. The fractions were evaporated.

1.3. TLC – Plates of pre-coated Si gel 60 F₂₅₄ (Merk) with a mobile phase of *n*-hexane/EA/acetic acid (14:6:0,3). After development, the plates were observed under a 254 nm light and sprayed with sulfuric vanillin, heated at 100°C for 10 minutes and observed.

1.4. Preparative TLC – The same plate and mobile phase from the TLC was used. The compound of interest was placed throughout the placement line marked on the plate and observed under a 254 nm light. The compound was scrapped off the plate and a small quantity of EA was added. The silica was filtered with pressure and the resultant solution was evaporated in a tube.

1.5. ¹H NMR – recorded in D₂O or MeOD on a Buker AVANCE I 500 MHz spectrometer equipped with a cryoprobe.

2. The liposomes

2.1. The construction – In a balloon, 200 µL of cholesterol (7.75 mg/ml ethanol), 200 µL of Poupartone B (5 mg/mL ethanol), 500 µL of DOPC (23,9mg/ml ethanol) and 22,4 µL DOTAP (25 mg/ml chloroform) were added and evaporated. After adding 2 ml of PBS, the solution was vortexed and filtered with pressured Azote with membranes with 0,4 µm, 0,2 µm and 0,1 µm pore diameter, 3 times each. The solution was then centrifuged at 35000 rpm for 2h at 4°C. The supernatant was taken and kept and to the sediment, 2 ml PBS were added to resuspend. 10 µL were taken and

complemented with 990 μL Milli-Q water, a dilution of 100 times. To the solution of PBS, 543,5 μL of heparin (184 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS) were added and placed under magnetic rotation for 30 minutes. The solution was centrifuged under the same conditions 2 times more, repeating the following steps (except the addition of heparin), and after the last resuspension, 10 μL were removed and complemented with 990 μL Milli-Q water in another tube.

3. Heparin

3.1. For the solution, according to Marques *et al* (2014)⁶¹, with this formulation, for 1 ml of liposomes, 100 μg of heparin is needed.

3.2. The quantification of the heparin on the surface of the liposomes was done indirectly through ^1H NMR spectra of the supernatants, that were evaporated and then added D_2O , with a 50 μL of maleic acid 5 mM solution in D_2O . The positive sample was a solution of 100 μg heparin in 1400 μL D_2O + 50 μL of the maleic acid solution.

4. Validation

4.1. The quantification of Poupartone B in the liposomes was assessed through analytic HPLC in a RP select B LiChrospher 60 column with 0,1% formic acid as mobile phase.

4.2. The calibration and validation were done in the same system with a set of mother solutions of the Poupartone B in ethanol and the liposomes formulation in ethanol with a 5-dilution factor and their respective dilutions to achieve 5 solutions with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concentrations in ethanol.

5. Stability – The stability parameters were assessed in a DLS Malvern Zetasizer (Naso ZS, Malvern Instruments, UK) at 25° C in the referred Milli-Q water solutions at day 0, without and with heparin, and at day 8. During that time, the samples were kept at 0.8°C isolated with parafilm.

6. Toxicity

6.1. Cytotoxicity in zebrafish larvae – The larvae were distributed, 15 to 25 per well in plaques with 6 wells, as presented in Anexo XII. Each well had a different concentration in a decreasing order, followed by the negative controls. The Poupartone B was diluted in DMSO. The concentrations were measured to achieve concentrations of 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 3.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, with a vehicle negative control (DMSO), vector negative control (empty liposomes) and a negative control, for the first test, and concentrations of 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, with a vehicle negative control (DMSO), a vector negative control (empty liposomes) and a negative control, for the second test. The plates were incubated at 28°C for the 3

days of the test and observed. At t_0 , t_{24} and t_{48} the means were cleaned and 5 ml of new mean with the respective concentrations was added. The qualitative assessments were noted in tables of observations.

7. Effectiveness

7.1. *In vitro* antiplasmodial activity – The culture of *P. falciparum* infected RBC was performed according to Trager et Jansen (1976)⁶⁸.

1.3. Results

1. Extraction of the leaves and the isolation and purification of active compounds

After the steps of extraction from the *P. borbonica* leaves, the preparative HPLC technique was implemented to separate the compounds previously mentioned.⁴⁵ From this step, several additional compounds were isolated, namely the most significant ones: compound A, B and B_{down}, that appeared before the Poupartone A, B and C in the chromatogram shown in Anexo II. The TLC afterwards elucidated the structural relation of these compounds to that of interest. As shown in Anexo III, compound A was characterized by its low R_f value in TLC, distinctive from the other compounds with antiplasmodial properties. Therefore, this compound was not considered a priority for further research. Compound B and B_{down}, one of its contaminants, for exact opposite reasons, were considered in the basis of the hypothesis of having antimalarial activities. After purification through preparative TLC, compound B and B_{down} was investigated for structural elucidation. ¹H NMR spectra were obtained for compound B and B_{down} and is presented in Anexo IV. These spectra, when compared with Poupartone B's ¹H NMR spectra displayed in Anexo V, show differences and similarities. Compound B and Poupartone B appear to have a similar profile. As a result, the compound B and B_{down} would be evaluated in tests *in vitro* along with the Poupartone B and the liposomes formulation.

2. The Liposomes

The liposomes were constructed through hydration of the lipidic film and were analyzed as to their quality and stability. The parameters used were the size, polydispersion index (PDI) and zeta charge. These were important because, as explained previously, the delivery is dependent on these factors. The results can be seen in Anexo VI and VII. It was considered that the size could go up to 250 nm because, even though the liposome has to be small, heparin is a big molecule that needs to be accounted for. The PDI should be inferior to 0.5 although ideally under 0.2 because the uniformization of size is important for the predictability and safety of the formulation. And, finally, the zeta needed to be positive, the higher the better until a limit around 30 mV to reduce chances of toxicity.

3. The heparin

The quantification of the heparin on the surface of the liposomes had to be done indirectly, since the quantity is so little that it falls below the detection limit of attempted several techniques. Hence, the method used was ¹H NMR spectra on the supernatants of the

ultracentrifuges, that contained the excess heparin that wasn't incorporated. To integrate, a maleic acid 5 mM solution in D₂O was used, as referred. Every solution was in D₂O to prevent the interference of the solvent in the spectra, as had happened with H₂O and methanol. The heparin molecule and ¹H NMR spectra can be observed in Anexo VIII. The pic around 1.9 ppm is the proton from the acetyl group of the sugars in the heparin molecule. The pic around 6.1 ppm are the protons from the double bond of the maleic acid. Through the integration of the maleic acid and the control of heparin, a percentage of heparin in the supernatants is found and the average percentage of heparin is calculated: 25.78% ± 0.63. This corresponds to 25.78 µg of heparin in the surface of the liposomes. This quantity is thought to be adequate, as it stays within the interval of concentrations used by Marques *et al*, in which the concentration of 1 µg and higher of heparin acquired for targeting and anti-plasmodium effects.⁶¹

4. The validation

For the calibration and validation of the quantifying method calibration lines were constructed. The table with results can be analyzed in Anexo IX and the graphics from the validation report on Anexo X. From the report's Figure 2, it is shown that the accuracy profile increases from the 20 µg/ml concentration and in Figure 3 it is shown that the risk of mistakenly quantifying a concentration diminishes greatly from the 20 µg/ml concentration. From the linear profile in Figure 5, it is observable that the introduced concentrations and the quantified concentrations by the method are very approximate, and so the method is linear and reproducible between the set range of concentrations, with a lower risk between 20 and 100 µg/ml. Afterwards, each time a new group of liposomes was built, a calibration line was built as well for quantification purposes. The encapsulation efficiency was 15.39 % ± 13.47 with an average of 375.2 µg/ml ± 299.3 of Poupartone B in the liposomes, but some factors should be considered (see Anexo VI e VII for results). During the construction process of the liposomes, when more centrifugations were done, it lead to losses in concentration of the Poupartone B, in the same way there were losses in the step of extrusion. Even when changing between plant samples used to build the liposomes (liposomes from 20170320), a difference in encapsulation efficiency can be noted. It's important to add that even if this happens, the viability of the liposomes is not in question and they can still be used in tests after being diluted to the appropriate concentrations.

5. The stability

The stability of the formulation over time is a key factor, because when testing or applying the formulation, it won't be used completely in the day of construction. Therefore, assuring the quality of the formulation during the period of the tests is essential. For this purpose, two new lots of liposomes were built by two different operators and evaluated in size, PDI, zeta and Poupartone B concentration at day 0 and day 8 (see Anexo VII). As it is shown, the parameters did not suffer relevant variations over time and the concentration decreased less than 10%, which is insufficient to assume the compound degraded or the liposomes lost their integrity. Hence, the formulation is stable over the course of one week, which is sufficient for the subsequent tests.

6. The toxicity

The model used to assess the expected toxicity and to compare it between the *naked* Poupartone B and the formulation was the zebrafish model. It proposes the use of fish, *Danio rerio*, as a vertebrate model for screening developmental effects of exposure to chemicals, e.g., natural compounds. These relatively small fish reproduce rapidly in big quantities with the advantage of an ex-utero embryonic development that enables, along with their transparency, a visual follow-up of toxicological effects on morphology and embryonic development. Their similarities of metabolic pathways, cellular structures, signaling processes, organ anatomy, physiology, development stages and cognitive behavior to nonhuman mammals, namely mice, allows for comparison between what happens *in vitro* and what could happen in *in vivo* models.^{47,66,67} Therefore, this model presents a rapid and inexpensive method to evaluate the toxicological effects of chemical compounds. A summary of the development stages can be found in Anexo XI. The noted parameters of this test were the observable modifications in the morphology, size and behavior: embryonic movement, heartbeat, blood circulation and necrosis of the tail. The endpoints were acute lethality, when the embryo or larva died, because of coagulation, non-existence of somites or no heartbeat. The negative controls were observed first, and then the other concentrations, to try to find qualitative differences between the embryos and subsequent larvae. A picture with the plates can be observed in Anexo XII. The table with observations for the first test can be found in Anexo XIII. In summary, there were subtle differences for these concentrations between plates. Initially, the embryos from the plaque with the compound seemed to suffer more necrosis of the tail and slow heartbeat and exited the chorion sooner than its liposome counterparts, accounting for possible toxicity by contact.

But as the test advanced and all the embryos exited the chorion, there were no significant differences in number or conditions to assert a conclusive difference between the compound and the formulation. The punctual morphological problems were inconclusive, as they only appeared in one or two larvae in a well with compound or formulation and in the controls as well, which meant it could be just natural occurring abnormalities. The overall set was that larvae from both plates were shorter and with a cerebral volume slightly inferior to normal. Although considerably more larvae in direct contact with the compound presented these changes and abnormal movement, it was not enough to account for a definite neurotoxicity conclusion. Hence, a new test was performed in the same conditions but with higher concentrations as disposed in the materials and methods.

From the second test, more conclusions were taken regarding toxicity and lethality. The table of observations can be found on Anexo XIV. With higher concentrations and a higher number of embryos, it became clearer that the compound alone appears to present a toxicity by contact that forces the larvae to hatch sooner than when in contact with the liposomes or in the controls. In fact, the chorion sizes varied greatly when directly exposed to the compound and the hearts and tails of the embryos showed early signs of toxicity that weren't present on the embryos on the liposome's plaque or the negative wells. In the Anexo XV the graphics with the number of embryos through time in each well can be observed. Also, in the same annex, graphics that compare the survivability of the zebrafish in each well and plate can be found. From these, it's observable that the number of deaths at 10 and 5 $\mu\text{g/ml}$ concentrations differ greatly between the direct compound and the formulation. Half of the larvae were dead with the compound directly at 5 $\mu\text{g/ml}$ at the end of the test, which accounts for a DL_{50} (the concentration that is enough to kill half a population) of 5 $\mu\text{g/ml}$ without the formulation. As for the formulation, with 15 $\mu\text{g/ml}$ all the population died and with 10 $\mu\text{g/ml}$ only 2 larvae died, thus the DL_{50} is set between these concentrations. This demonstrates, lethality wise, that the formulation protects the larvae from dying, although it doesn't protect them from the compound's effects, meaning the compound is delivered. As a matter of fact, the compound alone exhibited morphological alterations, that included the disappearance of somite, lack of circulation, necrosis in the tail, smaller size and cardiac toxicity, with a diminished heart rate and abnormal swimming movements and spasms, once outside the chorion. These same abnormalities were also observed with the formulation. In fact, these effects were observed until the end of the test without accounting for as many deaths as without the formulation, meaning a possible sustained release through time that diminished the lethality of the compound without

refraining its effects. Lastly, when comparing the liposomes with and without the compound, the only remarkable difference is a slight necrosis in the tail that is possibly due to the tensioactive properties of the liposomes or its charge, as it doesn't appear similar to the necrosis in the presence of the compound and it doesn't seem to greatly affect the circulation of the tail or their movement.

7. The effectiveness

In the *in vitro* tests, two strains of *P. falciparum* were used: 3D7, chloroquine sensitive, and IPC 3445, partially resistant to artemisinin. The tests were performed, as mentioned, according to Trager et Jensen (1976)⁶⁸. A parasitic by-product of the lactate dehydrogenase, when the parasite converts pyruvate to lactate, can be turned through another reaction into a molecule that can be revealed and measured by a colorimetric reaction. The absorbance can then be translated into a number of living parasites, *i.e.*, survivability of the parasite. The results obtained are presented in Table I. Unfortunately, despite the supposed potential of the B and B_{Down} compounds, the survivability of the parasite was similar to the controls, so it can be deduced that they have no antiplasmodial activity. As for the Poupartone B and the formulation, a difference is found between the two. In both strains the liposome with the Poupartone B is slightly more active than the compound alone. As the formulation appears to be somewhat more active than the compound alone, it could be that the liposome delivers the compound to the pRBC only and that this improvement is due to the heparin and consequent targeting. The presence of DOTAP in the liposome, as a positive lipid, might also help this efficiency in the way that it is thought that, because it can be protonated, it augments the up-take of the liposomes to cells by 4x. It might also have a slight antimalaria activity.⁵⁴ More studies would be necessary to account for this with certainty.

Table I - Table of results from the *in vitro* tests with *Plasmodium falciparum*.

Plaque	IC ₅₀ 3D7	IC ₅₀ IPC 3445
Poupartone B	0.6 ± 0.15 µg/ml	0.37 ± 0.16 µg/ml
Liposome + Poupartone B	0.4 ± 0.05 µg/ml	0.35 ± 0.08 µg/ml
Compound B	NA	NA
Compound B _{Down}	NA	NA
Control	NA	NA

NA – Not Active

1.4. Conclusion

The set main objectives of this work were to evaluate the formulation regarding its quality, stability, toxicity and efficacy. These parameters served as pin-points to assess the formulations viability for future *in vivo* tests. Through this process, new compounds were discovered and evaluated, but unfortunately rendered no noteworthy results. In the end of this part of the research, the formulation was validated and evaluated with success.

From the results presented, the formulation proved to be according to the sought parameters. The encapsulation efficiency was reasonable and the amount of heparin sufficient to accomplish targeting without great unwanted effects. The stability was demonstrated for the course of eight days with success, indicating not only the optimization of the formulation, but also the stability of the compound itself, that is very constant when stored in colder temperatures (-24 to 0.8°C). For the toxicity, as referred, the zebrafish model proved invaluable by allowing a fast inexpensive direct evaluation of the compound's and formulation's effects on embryonic development. From these, a significant DL_{50} difference was derived between the direct compound and the formulation. However, both developed toxicity overtime, which can be related to the release, even if at a slower pace, by the liposomes. The total absence of toxicity would only be possible if the liposomes didn't allow the release of the compound. These results reveal that not only the compound is released by the formulation, but that it also protects the cells from toxicity effects by lowering the DL_{50} in relation to the absence of formulation. Lastly, as for the *in vitro* tests, the formulation accomplished a diminished IC_{50} in both strains that may be accounted for the heparin's effect. *In vivo*, the objective is the release, preferentially after targeting to the pRBCs.

Presently, the formulation appears to be viable for *in vivo* tests with cerebral malaria mice models. In these tests, the true value of the formulation and its effects will be revealed, hopefully with good results. The ultimate objective of a safe novel working formulation with a new and different compound is to aid the fight against malaria and to hopefully, not only diminish the mortality and incidence rates of the disease, but to also eradicate it in a near future.

2. Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, E.P.E



2.1. Introdução

A instituição Unidade Local de Saúde de Castelo Branco, EPE, começou por ser o Hospital Amato Lusitano, fundado em 1977 e assim nomeado em homenagem ao médico Dr. João Rodrigues, assim conhecido, um importante e influente médico do século XVI. De acordo com o Diário da República nº 212 de 2 de novembro de 2009, é criada a ULS de Castelo Branco, que engloba o hospital e centros de saúde da Beira Interior Sul e do Pinhal Interior Sul. Desta forma, é constituída numa entidade pública empresarial dotada de autonomia administrativa, financeira e patrimonial que presta cuidados de saúde à população pelos quais é responsável.^{69,70}

O presente estágio decorreu nos serviços farmacêuticos da ULSCB. Os SF têm diversas áreas e uma equipa de profissionais que asseguram a prestação de cuidados farmacêuticos e o acesso ao medicamento a todas as instituições de saúde e respetiva população, como descrito no decreto supramencionado.⁷⁰ Os SF garantem primeiramente o circuito do medicamento, não só aos serviços hospitalares, bem como em ambulatório e centros de saúde. Este compreende a obtenção, produção, distribuição e controlo de todos os medicamentos, alguns dispositivos médicos e outros produtos farmacêuticos. Compete igualmente aos SF a cedência de informação por forma à correta utilização dos medicamentos, tanto por parte de profissionais de saúde como dos doentes. Como serviço com capacidade técnica e científica específica sobre o medicamento e todos os seus aspetos, também compete aos farmacêuticos deste serviço integrarem a Comissão de Farmácia e Terapêutica, fornecerem dados de consumo da ULSCB e emitirem o seu parecer técnico quando pertinente.⁷¹ Para assegurar estes serviços, os SF têm horário estabelecido de presença física e de regime de chamada ou prevenção.

O estágio decorreu de 3 de abril a 26 de maio e este relatório pretende elucidar as suas características particulares e narrar os seus resultados. Este hospital foi escolhido por diversas razões, nomeadamente por ser um hospital universitário, por ter um conjunto de valências variadas e pela localização central na cidade de Castelo Branco. Desta forma, a probabilidade de contato com as diferentes áreas dos SF e com variadas situações no quotidiano de um hospital abrangente serviram de grande atrativo ao que pessoalmente pretendia do estágio: ter uma experiência real do que vive e faz um farmacêutico hospitalar no seu quotidiano.

2.2. Estrutura

A estrutura dos SF farmacêuticos está organizada num organigrama que compreende os recursos humanos do mesmo – 9 farmacêuticos, 5 técnicos e 4 auxiliares. Cada membro tem um conjunto definido de tarefas que compreendem as áreas dos SF e proporcionam o seu bom funcionamento. A direção farmacêutica delega as funções a colegas farmacêuticos cujas competências técnicas são adequadas em: gestão, ambulatório, distribuição individual diária em dose unitária, distribuição tradicional, farmacovigilância, farmacotecnia e circuitos de medicamentos especiais, como sejam hemoderivados, estupefacientes, benzodiazepinas e citotóxicos. Existem duas áreas farmacêuticas que, ao presente, não se encontram em plenas funções: a área de reconstituição de medicamentos estéreis não citotóxicos, nomeadamente nutrição parentérica, e a área de farmacocinética clínica. Em ambas as situações, e sempre que pertinente, é prestado o apoio possível.

I. Gestão

A gestão é assegurada pela direção farmacêutica. Faz parte das funções dos SF o planeamento da medicação necessária através de previsões baseadas no histórico de consumo e nas tendências de utilização. Os SF devem definir os critérios de escolha de um medicamento e emitir pareceres técnicos, de acordo com o procedimento do processo. A gestão de stocks otimiza a aquisição e os consumos de medicamentos, evitando desperdícios. Quando são necessários medicamentos novos ainda não aprovados na instituição, os SF estão encarregues de iniciar o processo e de emitir um parecer técnico sobre os mesmos. Por vezes, estes medicamentos necessitam de AUE, como de acordo com a Deliberação nº 1546 de 2015.⁷² Este processo garante a utilização legal excecional de medicamentos para que, em caso de um doente específico ou de necessidade da saúde pública, exista sempre acesso às terapêuticas prementes.

II. Ambulatório

O ambulatório compreende a cedência gratuita de medicação a doentes que não estejam no internamento do hospital e que estejam referenciados para o efeito. São doentes com patologias ou condições especiais que, desta forma, conseguem ter acesso ao tratamento. Estas patologias estão legisladas em várias portarias e despachos que permitem a cedência gratuita dos tratamentos quando há consultas da especialidade no hospital e em casos excecionais legislados.^{73,74,75} Por exemplo, a ULSCB não tem consulta de especialidade de HIV/SIDA e por isso não cede medicamentos com essa indicação. Este tipo de cedência deriva da necessidade de vigilância e controlo de determinadas patologias crónicas e das suas

terapêuticas, quer pela gravidade da patologia, pela toxicidade dos medicamentos ou o seu elevado valor económico.⁷⁶

Aquando a cedência, o farmacêutico procede à identificação da pessoa, acede à ficha do doente em causa e verifica as prescrições e respetiva terapêutica.^{77,78,79} Durante o atendimento é importante fazer perguntas para averiguar a ocorrência de efeitos adversos, a forma e frequência de toma, a forma de armazenamento dos medicamentos e dar informações e esclarecer dúvidas. Este diálogo é particularmente importante, porque a medicação é gerida pelo doente e muitas vezes administrada pelo mesmo, pelo que o sucesso dos tratamentos dependem do correto esclarecimento e apoio ao doente. Este acompanhamento fomenta a adesão à terapêutica e possibilita uma maior optimização do tratamento.^{76,80}

III. Distribuição Individual Diária em Dose Unitária

A distribuição individual diária em dose unitária compreende a parte do circuito do medicamento que se relaciona com o internamento do hospital em cada serviço. Em colaboração com os Serviços Clínicos, é uma metodologia que racionaliza a terapêutica ao tornar disponível o medicamento correto na quantidade e forma corretas, de acordo com a prescrição, para o doente correto.^{76,80}

Na DIDDU a intervenção farmacêutica é essencial e reporta-se a duas fases: a validação e a verificação. Na validação, a farmacêutica depara-se com a prescrição, que inclui os dados clínicos do doente, como o nome, a idade, o diagnóstico, o médico prescriptor, as datas, a terapêutica e a sua calendarização, e posologia. A validação passa por verificar doses, duplicações, duração das terapêuticas, vias de administração, reações alérgicas, RAMs, outras patologias associadas, entre outros e, sempre que necessário, abordar o médico sobre dúvidas que surjam. A verificação é o passo antes da libertação da medicação para as próximas vinte e quatro horas, em que, por serviço, a cama, o doente, o fármaco, a forma farmacêutica, a dose e a quantidade da medicação são verificadas.

IV. Distribuição Tradicional

A distribuição tradicional engloba a distribuição da medicação, por serviço ou CS, dos produtos multidoses e de alta rotatividade, também como apoio à DIDDU. Os produtos e quantidades foram definidas entre os SF e a equipa dos respetivos serviços clínicos. São acondicionados em armários próprios, frigoríficos ou Pixys, armários com software próprio de acesso restrito com diferentes graus de acesso, que disponibiliza apenas o medicamento

pedido, diminuindo a chance de erro. Estes armários com sistemas semi-automatizados existem em serviços cuja rotatividade de medicamentos é elevada como cuidados intensivos, urgências, diálise ou salas de bloco operatório.

V. Farmacotecnia

A farmacotecnia compreende a preparação, pelos SF, de medicamentos que têm como destino doentes específicos ou preparações em grande quantidade, como o reembalamento. Engloba preparações asséticas e estéreis ou citotóxicas individualizadas.⁷⁶

Os medicamentos citotóxicos, como o nome indica, são tóxicos tanto para o manipulador como para o doente, pelo que a sua produção e distribuição implica uma segurança adicional e uma segregação do circuito normal do medicamento.^{76,80,81} Estes medicamentos antineoplásicos são manipulados numa sala limpa de preparação com condições especiais, nomeadamente sala com circuito com pressão negativa e com uma câmara de fluxo de ar laminar vertical da Classe II B, como é o caso. Cada preparação é feita de acordo com a ficha de preparação, o protocolo e o doente e de acordo com procedimentos pré-estabelecidos. Como medicamentos de circuito especial, são registados os lotes para que possa haver rastreabilidade.^{76,80,81,82} Os doentes estão no hospital de dia e começam imediatamente a fazer a medicação à medida que este vai sendo produzida e entregue.

O reembalamento e rotulagem de medicamentos unidose é um método para adaptar os medicamentos à DDDU. Para isso pode ser necessário remover o medicamento do acondicionamento primário ou não, consoante o caso. Este processo inclui a toma de medidas para o correto acondicionamento e armazenamento das formas unitárias até ao momento da administração.⁷⁶ Um exemplo pode ser visualizado no Anexo XVI.

VI. Farmacovigilância

A farmacovigilância é um sistema nacional sob responsabilidade do INFARMED e transversal a todo o hospital, unidade de farmacovigilância. Compreende o registo e notificação de reações adversas aos medicamentos com o objetivo de atualizar o perfil de segurança dos medicamentos, com o intuito de aumentar a segurança e promover a sua correta utilização.^{76,83}

VII. Ensaios Clínicos

A ULSCB pode constituir-se centro de estudo clínico quando a sua população é pertinente para um estudo ou ensaio clínico, e como de acordo com a Lei n.º 73/2015 de 27 de julho.⁸⁴ Os estudos que são efetuados mais frequentemente são de Fase III e IV. Estes são conduzidos mantendo um olhar atento e contínuo na utilização dos medicamentos e dos seus efeitos por forma a melhorar o conhecimento sobre os mesmos. Assim, a ULSCB contribui para a progressão científica através, não só de uma observação contínua da utilização dos medicamentos, mas também ativamente em novas descobertas.⁷⁶

VIII. Circuitos Especiais de Distribuição

Finalmente, o circuito de medicamentos especiais refere-se a medicamentos regidos por legislação própria e cujo circuito e gestão estão segregados dos restantes. Nestes, o registo no circuito é feito por lote. Incluem os hemoderivados e os estupefacientes e psicotrópicos, e outros que, por características intrínsecas, tenham de ter um circuito específico, como vacinas e os citotóxicos.^{76,80} Estes medicamentos especiais acarretam risco biológico e/ou de segurança, pelo que a sua utilização implica medidas adicionais, como sejam o registo de todas as atividades – receção, armazenamento, requisição, distribuição e administração –, do lote, laboratório, doente e justificação num modelo de registo oficial juntamente com o certificado de análise emitido pelo INFARMED.^{78,87} Estes registos asseguram a rastreabilidade do medicamento e garantem o seu controlo, como de acordo com a legislação.^{76,78-80,86} Em especial para medicamentos estupefacientes e psicotrópicos existe um elevado controlo, por exemplo no que diz respeito à conferência de stock, semanalmente, ao armazenamento, num cofre com chave e acesso restrito, e aos registos de aquisição e requisição, nos respetivos ANEXO VII e X dispostos do Anexo XVII, como de acordo com a legislação.^{85,86}

2.3. Análise SWOT

Um estágio nos SF é maioritariamente observacional e auxiliador das tarefas do trabalho farmacêutico. Consiste em acompanhar as farmacêuticas no seu dia-a-dia, cada uma na sua área, e tentar apreender ao máximo a realidade de uma farmacêutica hospitalar. O período de estágio, pela altura em que se realizou, contou com algumas particularidades que contribuíram para uma melhor vivência do ambiente hospitalar e de saúde pública. Estes serão explicados na análise SWOT seguinte, que consiste numa metodologia de análise das Forças (Strengths), Fraquezas (Weaknesses), Oportunidades (Opportunities) e Ameaças (Threats) de uma atividade.

2.3.1. Forças

Este estágio revelou rapidamente as suas forças ou pontos fortes. Ainda como estudante, num mestrado integrado diversificado, o contacto real com a mecânica dos SF e da ULSCB serviu de meio de aplicação para o conhecimento adquirido ao longo do estudo.

Rapidamente foi necessário encarar o trabalho de estágio com seriedade e responsabilidade. Ler os procedimentos e alguma legislação complementar como introdução às tarefas deu um grande impulso na aprendizagem rápida das tarefas e da sua correta *performance*. No entanto, mais do que a teoria, pôr em prática os conhecimentos e associá-los a situações reais concedeu uma dimensão diferente à experiência adquirida. Na dispensa em ambulatório, por exemplo, a terapêutica distinta para esclerose múltipla, artrite psoriática ou psoríase, como o adalimumab, golimumab ou etanercept, e os seus esquemas posológicos, através do contato com doentes, proporcionaram uma aprendizagem com maior impacto e uma incorporação de conhecimentos mais real. Também com os protocolos na produção de citotóxicos, uma bomba elastomérica com uma determinada composição em levofolinato de sódio, fluoruracilo e cloreto de sódio pertence a um determinado protocolo e é destinada a um doente específico. Desta forma existe uma correspondência entre o trabalho praticado e o doente a que se destina, que usufrui desta forma da qualidade do circuito do medicamento.

A nomenclatura por DCI e o rigor da aplicação da legislação, quanto à nomenclatura LASA, diminuíram a probabilidade do erro e aproximaram-se à aprendizagem universitária.⁸⁷ A participação no preenchimento de formulários e na cedência de medicamentos de circuito especial teve também particular relevância para compreender o elevado controlo que os envolve e a necessidade do mesmo. Ter a liberdade de tomar iniciativa de participar em várias atividades ao longo do dia, a ajudar TDT e farmacêuticos, de

assistir à produção de citotóxicos ou ajudar no dia de greve e ver os resultados daí derivantes foi muito gratificante.

O impacto para um farmacêutico da responsabilidade de ter um doente real que depende do seu rigor técnico e científico é um fator que só decorre no ambiente de trabalho, o qual se exigia neste estágio e era, no fundo, o seu objetivo. Desse ponto de vista, o estágio tem a força necessária para transmitir essa relevância.

2.3.2. Fraquezas

Alguns pontos fracos podem ser salientados. A duração do estágio é inferior ao ideal para tomar verdadeira noção de todas as nuances de cada área de perícia farmacêutica. Cada peça do sistema tem uma legislação, procedimento e pormenores específicos que, distribuído pelas horas de estágio, revelam não ser ótimos para uma exploração aprofundada de cada uma. Portanto, igualmente pelo fato de ser de pouca duração, não permite a autonomia que seria desejável, mantendo o estagiário sempre um pouco aquém da contribuição e do potencial que poderia oferecer. Também pelo fato de não estarem a funcionar em pleno as áreas de nutrição e farmacocinética, a experiência fica de sobremaneira incompleta no que diz respeito a um conhecimento completo e geral a todas as áreas farmacêuticas hospitalares que eram o objetivo do estágio. Além disto, infelizmente não foi possível acompanhar as farmacêuticas na visita médica ou nas consultas no CS.

2.3.3. Oportunidades

O estágio proporcionou diversas oportunidades de aprendizagem e desenvolvimento de capacidades em tempo real derivado do quotidiano dos SF. Durante o estágio surgiu a questão de as soluções injetáveis estarem a ser distribuídas em DIDDU fora do acondicionamento secundário e que, por isso, levantavam questões quanto à sua estabilidade, em relação à fotossensibilidade. Foi pedido então que fosse feita uma lista dos medicamentos no formulário interno do ULSCB que cumprissem esses requisitos e que fosse investigado todos os que necessitassem de um método especial de reembalamento, nomeadamente com papel de alumínio e nova etiquetagem. Essa lista foi elaborada para consulta e as medidas respetivas foram adaptadas em conformidade. Também aconteceu durante o estágio o surto de sarampo em meados de abril que permitiu um conhecimento acrescido do papel do ULSCB em relação à vacinação da população e do pessoal médico. Como de acordo com as normas DGS, é fortemente recomendável que todos os profissionais de saúde estejam vacinados contra doenças contagiosas que representem um perigo de saúde pública, da mesma forma que o programa nacional de vacinação é recomendável e universal.^{88,89} Apesar de ter sido considerado erradicado em Portugal, o

sarampo não está erradicado a nível global, pelo que a proteção aquando de viagens para locais de risco também é recomendável. Apesar da forte recomendação, nem toda a população está ou pode ser vacinada, pelo que surtos como os que decorreram se tornam possíveis.⁸⁹ É da responsabilidade da ULSCB, em colaboração com a ARSCentro, a aquisição e distribuição pelos CS e hospital das vacinas que asseguram a proteção da população.^{88,89,90} Adicionalmente, visto a farmacotecnia na ULSCB incluir a produção de citotóxicos, houve oportunidade de assistir à sua preparação.

2.3.4. Ameaças

Finalmente, como ameaças ao estágio compreende-se, por exemplo, os imprevistos que escapam ao controle da instituição. Como por exemplo o ataque cibernético de 12 de maio que acabou por ter consequências nos dias seguintes e impediu, nesses dias, que o trabalho se procedesse de forma normal, ou a greve de 26 de maio e a tolerância do dia 12 maio que condicionaram também a atividade do hospital. Também os tempos mais calmos constituem ameaças ao proveito do estágio e foram colmatados com atividades autodidatas de leitura entre outras. Estes acontecimentos, apesar de inofensivos, perturbaram a normalidade do estágio e diminuíram o rendimento de aprendizagem nesses dias.

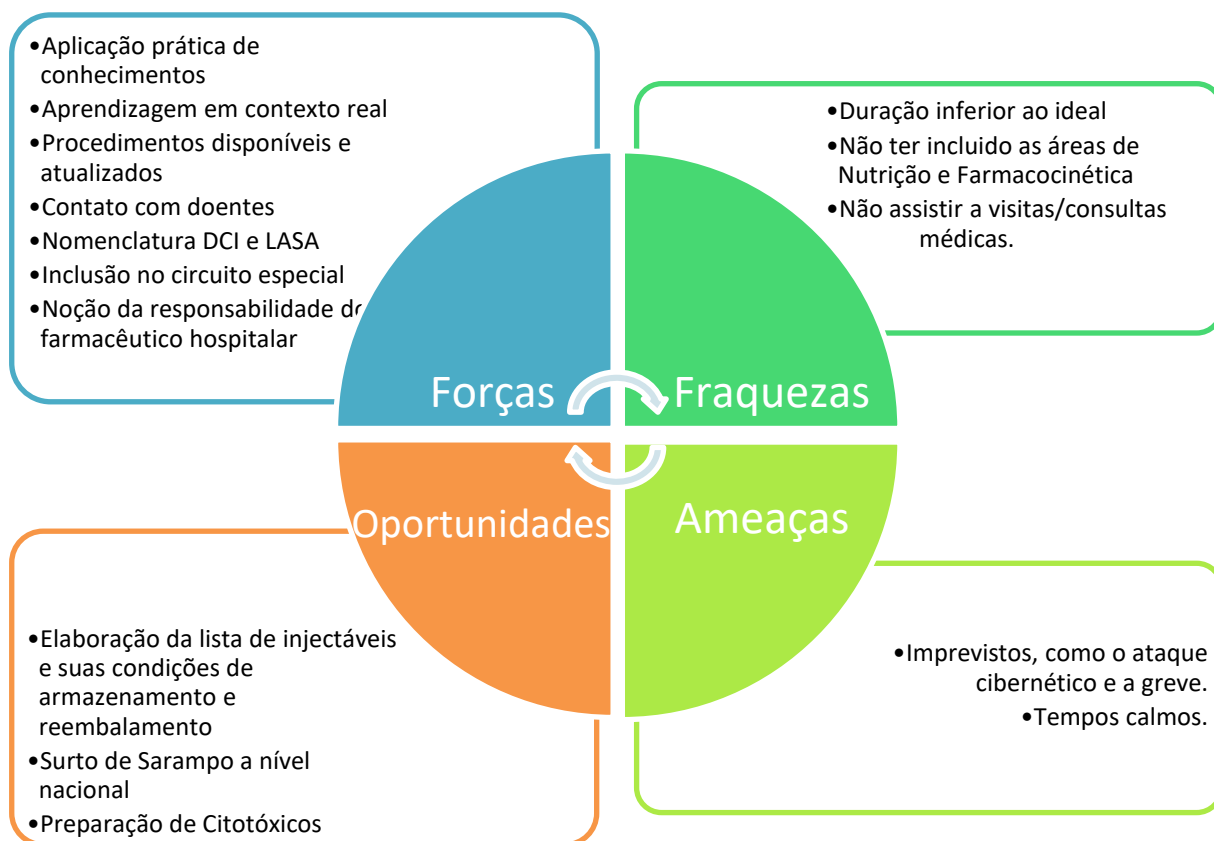


Figura 3 – Esquema resumo da análise SWOT.

2.4. O papel do farmacêutico

Os SF são o centro da atividade farmacêutica no ULSCB e um exemplo do trabalho de qualidade que é feito todos os dias em prol dos doentes. Os farmacêuticos que o constituem são responsáveis por toda a cadeia do medicamento, desde o planeamento à utilização e ao efeito no doente, e é a infabilidade deste circuito que demonstra o valor da intervenção farmacêutica. A implementação da reconciliação terapêutica e o aconselhamento farmacêutico na terapêutica dos doentes são adições fundamentais ao conjunto de serviços já disponibilizados.⁹¹ Também a informação fornecida a serviços certificados e profissionais de saúde aumenta a segurança da atividade hospitalar e diminui a probabilidade de erro. Para que este contributo possa ser otimizado, todavia, é necessária a colaboração da restante equipa clínica, para que a comunicação seja facilitada e todo o esforço seja direcionado em prol da saúde pública e do doente.

2.5. Conclusão

Em jeito sumário, após este estágio de dois meses estar concluído, posso afirmar, pessoalmente, o seu valor inestimável. Apesar de curto, como referido, conferiu verdadeiro saber na primeira pessoa sobre a realidade da carreira do farmacêutico hospitalar, das suas funções e responsabilidades.

A aplicabilidade do conhecimento adquirido ao longo destes anos no mestrado apenas poderia ser realizada no ambiente próprio do dia-a-dia de uma unidade de saúde hospitalar como a ULSCB. Desse ponto de vista, é o meu parecer que daí resultou um alto enriquecimento profissional e pessoal e que a decisão de incluir um estágio em Farmácia Hospitalar no estágio curricular foi uma, não só indispensável, mas afortunada.

Uma nova visão abre novas perspetivas sobre o que um futuro farmacêutico pode esperar atingir enquanto agente de saúde pública em Portugal. Termino o estágio um pouco mais perto do objetivo de me tornar numa profissional de valor que trabalha pelo doente, para do doente, enquanto agente de saúde pública e visa proporcionar os melhores cuidados de saúde e bem-estar.

3. Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Nuno Álvares



3.1. Introdução

O estágio em farmácia comunitária surge integrado no currículo académico para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas conferido pela Universidade de Coimbra, e em conformidade com as normas europeias para reconhecimento do mesmo.⁹⁶ O relatório de estágio, acrescido aos anos de estudo e conjuntamente com a monografia, compreendem os requisitos para ingressar na Ordem dos Farmacêuticos e exercer em pleno as funções de farmacêutica.⁹⁷ Com o mesmo, pretende-se ganhar experiência e competência na realização de tarefas base, fundamentais à prestação de serviços farmacêuticos à comunidade, particularmente como farmacêutico em ambiente de FC.⁹⁸

Assim, o estágio na Farmácia Nuno Álvares teve início a 29 de maio e terminou a 25 de agosto. Compreendeu o horário normal da farmácia nos dias úteis, das 9h às 19h, e nos dias de serviço permanente, em horário diurno.

Esta farmácia foi escolhida em particular pela sua localização, central e relativamente próxima do Hospital ULSCB. Desta forma, haveria probabilidade de maior variabilidade de casos no atendimento e nas restantes valências, tornando-o mais polivalente e interessante.

A farmácia está situada na Avenida 1º de Maio em Castelo Branco e a equipa que a integra é constituída por 6 farmacêuticos e 2 técnicos de farmácia. Prima pelo bom atendimento e aconselhamento ao utente, fomentando uma saúde pública cuidada na comunidade em que está inserida. Além da cedência de MSRM e MNSRM, disponibiliza produtos de cuidados a grávidas, lactantes e lactentes, bebés e crianças, produtos de cosmética e dermocosmética para todo os tipos de pele e situações dermatológicas, produtos geriátricos diversos e suplementos variados. Dos serviços que disponibiliza, fazem parte: consultas de fisioterapia, nutrição e podologia, determinações de parâmetros biológicos, IMC, peso e tensão arterial, e bioquímicos, como colesterol total, triglicérides, glicémia, ALT, ácido úrico, ureia e creatinina.

Este relatório está organizado no formato de análise SWOT, compreende uma exposição do estágio com foco principal nas suas forças (Strengths), fraquezas (Weaknesses), oportunidades (Opportunities) e ameaças (Threats).

3.2. Análise SWOT

3.2.1. Forças

1. Percurso curricular

As aulas frequentadas e conhecimentos adquiridos foram a principal ferramenta que permitiu que o estágio decorresse com relativa facilidade, formando uma base a partir da qual foi possível construir uma estrutura de experiência prática.

As atividades extra empreendidas durante os últimos 4 anos também contribuíram de forma positiva. Por exemplo, em 2014 frequentei uma formação organizada pela Delegação Centro da Fundação Portuguesa de Cardiologia sobre a deteção e controle de fatores de risco nas doenças cardiovasculares. Deste modo, através da aplicação dos conhecimentos em atividades de rastreio, obtive ferramentas e experiência para realizar, não só a medição dos parâmetros bioquímicos referidos anteriormente, mas também a respetiva monitorização de situações já identificadas e a deteção precoce de desvios.

O estágio curricular no Observatório de Interações entre Plantas e Medicamentos frequentado durante 2 anos ofereceu bases concretas na pesquisa e aconselhamento, bem como no caso de interações entre plantas e medicamentos, o que contribuiu para um melhor aconselhamento farmacêutico da minha parte. Também estágios em FC, nomeadamente de verão, efetuados anteriormente forneceram suporte para trabalhar com o programa *Sifarma 2000*[®] e para adquirir conhecimento do circuito do medicamento e do funcionamento interno da farmácia.

2. Iniciativa

Num estágio curricular a iniciativa por parte do estagiário é fundamental. Todavia, por vezes, é um aspeto intimidante. Apesar da preparação teórica minuciosa, a inexperiência acaba por condicionar o estagiário, que tem de ultrapassar as suas limitações e o receio de uma situação nova. Através do apoio de todos os elementos da equipa, consegui rapidamente superar novas situações e fazer um bom trabalho.

3. Conhecimentos de inglês e francês

A localização central da farmácia na zona histórica de Castelo Branco proporcionou muitos atendimentos a turistas. Nessas ocasiões, os conhecimentos de inglês e francês facilitaram a comunicação e provaram ser instrumentos cruciais no exercício como farmacêutica e futura profissional de saúde.

4. Experiência por todas as áreas de FC

Durante o estágio, proporcionaram-me a oportunidade de passar por todas as vertentes da farmácia, nomeadamente, gestão e armazenamento dos medicamentos, medição de parâmetros bioquímicos, preparação de medicamentos manipulados, atendimento e aconselhamento ao utente e preparação individualizada da medicação.

5. Aconselhamento

Inicialmente, não foi fácil fazer um aconselhamento completo, por diversas razões. Apesar do conhecimento sobre a aplicabilidade dos princípios ativos, imediatamente surgiram diversas questões quando fui confrontada com um caso real. Perguntas como: a quem se destina, a idade, outra medicação ou patologias base, medicação atual ou a duração da situação, são dúvidas que devem ser colocadas e que nem sempre ocorrem numa fase inicial. Da mesma forma, o mesmo princípio ativo apresenta-se com nomes comerciais, formas farmacêuticas e dosagens diferentes. Inicialmente, processar toda esta informação e adaptá-la a situações concretas não era fácil. Com o decorrer das situações e com a informação transmitida pelos colegas, reuni capacidades para aprimorar a triagem ao utente e notei que o meu raciocínio lógico se tornou mais aguçado e perspicaz.

6. Casos Práticos

Ao longo do estágio evidenciou-se um conjunto de situações mais frequentes por parte dos doentes que procuravam aconselhamento farmacêutico. De seguida, são apresentados exemplos de algumas dessas situações.

I. Contraceção Hormonal de Emergência

Este medicamento requer uma criteriosa triagem inicial e um aconselhamento apropriado, mediante a situação. Do mesmo modo, é também imprescindível informar a utente sobre os métodos de contraceção disponíveis e referenciá-la para consultas de planeamento familiar disponíveis no CS.

II. Insónia ou dificuldade em dormir

Especialmente em condições de stress ou em geriatria, estes medicamentos são procurados para induzir e/ou prolongar o sono. É essencial ensinar o utente a fazer a higiene do sono e complementar o aconselhamento com a dispensa de um medicamento fitoterapêutico ou MNSRM, quando necessário. Esta intervenção é importante na medida em

que a utilização de benzodiazepinas e hipnóticos para dormir é frequente e tem perigos inerentes à sua utilização em terapêutica crónica, como habituação e dependência.

III. Situações como candidíase ou alteração da flora vaginal

Uma das principais afeções femininas relaciona-se com a alteração da flora vaginal, seja pela toma de medicação sistémica para tratamento de infeções, infeções vaginais ou alterações hormonais decorrentes da menopausa. É frequente as utentes reportarem prurido vaginal como estando associado a uma candidíase ou infeção, quando por vezes um hidratante ou gel de higiene íntima resolveria o problema que revela apenas um desequilíbrio de flora vaginal. É a nossa função esclarecer e aconselhar da melhor maneira.

IV. Afeções oculares

Os olhos são órgãos muito sensíveis. Por esse motivo, qualquer alteração nos mesmos precipitam os utentes a procurar usar ou a repetir colírios/pomadas oftálmicas contendo antibióticos e/ou cortisona que outrora os ajudaram numa situação similar. Por vezes, continuam a aplicar estes medicamentos sem saber que deviam parar ou que existem outras opções igualmente válidas e menos prejudiciais. O farmacêutico deve adequar o tratamento à situação e referenciar uma avaliação por especialista, sempre que julgue necessário.

V. Infeções urinárias

Esta afeção é muito frequente em mulheres e provoca um grande desconforto. Muitas vezes o tratamento passa pela toma de um antibiótico, mas é importante informar os utentes das alternativas. Quando as infeções são recorrentes, o aconselhamento farmacêutico é primordial quanto às medidas não farmacológicas a adotar e às vantagens da utilização de suplementos disponíveis com manose, *cranberry* ou uva ursina.

VI. Onicomicoses

Outra situação muito frequente são os fungos nas unhas, cujo aconselhamento é de competência farmacêutica. Todavia, são relevantes as questões que se colocam ao utente e que influenciam a decisão do profissional. Tive oportunidade de presenciar o exemplo de uma senhora que tinha onicomicose na unha do pé e que já tinha feito um tratamento de 6 meses com amorolfina prescrita pelo médico de família. Por isso, aquando do aconselhamento afigurou-se a melhor opção algo que pudesse aumentar o sucesso do tratamento, nomeadamente um kit de tratamento com ureia para que o antifúngico atuasse

com maior eficácia. Perguntámos à senhora se era diabética, ao que ela respondeu que sim, não o tendo mencionado anteriormente. Com esta informação, não pudemos dispensar aquele medicamento e optamos por direcionar a senhora ao médico.

VII. Dores musculares e/ou articulares

As queixas de dores musculares e/ou articulares são bastante frequentes. A utilização de anti-inflamatórios tópicos é bastante usual, no entanto por vezes, por alergia aos mesmos, estes não podem ser utilizados e outras opções são necessárias. Também a distinção entre situações crónicas ou agudas é pertinente, uma vez que o aconselhamento vai divergir.

7. Duração de Estágio

Ao contrário do estágio anterior, neste senti que a duração foi adequada. Pude perceber uma curva de aprendizagem crescente e que a partir de um certo momento adquirir competências para ter autonomia. Ou seja, apesar de estar continuamente a aprender e recorrer a ajuda sempre que necessário, a duração do estágio foi suficiente para que eu pudesse exercer em alguma medida as funções de farmacêutica com relativa independência.

3.2.2. Fraquezas

Infelizmente, o estágio teve algumas fraquezas. Uma delas foi que não tive oportunidade de assistir a qualquer formação ou rastreio ao público. Talvez esta falta esteja relacionada com a altura do ano em que realizei o estágio, em que o número destas atividades decresce.

3.2.3. Oportunidades

Equipa Variada

Uma das melhores surpresas do estágio foi a equipa da farmácia. Uma equipa diversificada não só em idade, mas em formação e experiência. A simpatia e sabedoria de todos os membros proporcionaram um ótimo ambiente de trabalho e aprendizagem. Por este motivo, a ajuda, compreensão e ensinamentos foram os mais enriquecedores.

Robot, Medical Dispenser[®] e Reflotron[®]Plus

A farmácia está enriquecida com vários equipamentos automatizados com diversas funções que facilitam e variam os serviços disponíveis na farmácia. Primeiramente, o designado *robot* é um ROWA e funciona como um armazém. Está instalado no 1º andar do edifício e armazena os medicamentos nas devidas condições de temperatura e humidade.

Desta forma, o espaço ocupado pelos medicamentos está otimizado, o seu acesso está interdito ao público e, quando pedido através do menu de atendimento do *Sifarma 2000*[®], ele entrega ao farmacêutico o medicamento solicitado. Estes estão organizados por prazo de validade, em que primeiramente é dispensado o medicamento de prazo de validade mais curto. Os erros são assim minimizados e o atendimento não é interrompido, permitindo ao farmacêutico facultar toda a informação relativa ao medicamento dispensado.

Na farmácia existe ainda o *Medical Dispenser*[®], um aparelho que organiza, através de um sistema informático, a terapêutica do doente em blisters semanais. Este serviço possibilita a diminuição dos erros da terapêutica quanto a esquecimentos e trocas, quando existe polimedicação, e auxilia o farmacêutico na garantia da adesão à terapêutica e no acompanhamento.⁹⁹

O Reflotron[®] Plus é um aparelho de medição de parâmetros bioquímicos utilizado pela fiabilidade dos resultados, uma vez que utiliza uma quantidade precisa de sangue (32 µL) medida por um capilar que contém heparinóide para manter a amostra nas melhores condições.

A farmácia tem ainda uma balança e dois aparelhos de medição da pressão arterial.

Manipulado

Entendo a produção de um medicamento manipulado como uma oportunidade. Pelo que pude perceber, o número de pedidos de medicamentos manipulados tem vindo a decrescer de ano para ano, e apesar da sua proximidade à ULSCB e a consultórios privados. Ainda assim, foi-me possível preparar um medicamento manipulado, desde a preparação das matérias primas e da embalagem, manipulação propriamente dita através da utilização de um Unguator[®], acondicionamento, rotulagem, preenchimento das fichas e cálculo do preço, tudo de acordo com a legislação.^{95, 100-102}

Formação

Uma das possíveis desvantagens da localização e da altura do ano em que o estágio decorreu foi a dificuldade em assistir a formações que, noutras condições seriam mais acessíveis. Ainda assim, tive a oportunidade de assistir a uma formação em Coimbra pela Escola de Pós-Graduação em Saúde e Gestão designada “Organização de um Serviço de Apoio aos Hipertensos na Farmácia”. O tema relacionava-se com novos aparelhos de medição de tensão arterial com sensores de medição em toda a braçadeira e abordou-se a

questão de que medições pontuais de tensão arterial não serem suficientes para aferir um problema cardíaco crónico.

Único Estagiário

Finalmente, uma das grandes vantagens deste estágio advém de ter sido a única estagiária da farmácia naquele momento. Foi-me permitido receber a total atenção de todos os membros da equipa e passar por todas as áreas da farmácia ao meu ritmo.

3.2.4. Ameaças

DCI VS Nome Comercial

Uma das grandes ameaças ao estágio é a diferença entre o nome por DCI e o nome comercial, que é o mais recorrente no atendimento. No começo, além de não ser possível recordar-me de todos os princípios ativos, muitas vezes os medicamentos procurados pelos utentes, por nome comercial, eram-me desconhecidos. Desta forma, a pesquisa de um medicamento aquando do aconselhamento tornava-se mais demorada. Para colmatar esta dificuldade, comecei a procurar os medicamentos por DCI, em vez de por nome comercial. Também fiz um resumo das várias situações de aconselhamento e, para cada uma, o medicamento mais apropriado, por DCI e respetivos nomes comerciais pelos quais são conhecidos. Assim, no fim do estágio esta dificuldade estava ultrapassada.

MSRM

Uma outra grande dificuldade do estágio são os MSRM. A obrigação do farmacêutico é assegurar a correta dispensa, bem como o uso racional do medicamento. No entanto, a dificuldade surge quando o doente não tem medicação suficiente para continuação do tratamento. Há vários motivos pelos quais isto pode ocorrer, nomeadamente quando as receitas não contêm medicação em quantidade suficiente até à próxima consulta ou pela dificuldade na marcação de novas consultas. Esta situação condiciona a ação farmacêutica: por um lado dispensar um medicamento que só pode ser cedido com receita, e por outro comprometer o sucesso da terapêutica ao negar a dispensa de um medicamento destinado ao tratamento de uma patologia crónica, que não pode ser interrompido sob penalização do bom sucesso do tratamento do doente. Ambas as decisões ficam sob responsabilidade do farmacêutico, no sentido do melhor desfecho em prol do doente.

Inexperiência no Atendimento

Finalmente, e como é expectável, a principal ameaça no estágio é a inexperiência da própria estagiária. Pela primeira vez a desempenhar funções de farmacêutica, é normal não estar preparada para a diversidade de situações que diariamente sucedem na farmácia. Aprender a lidar com algumas foi um processo interessante.

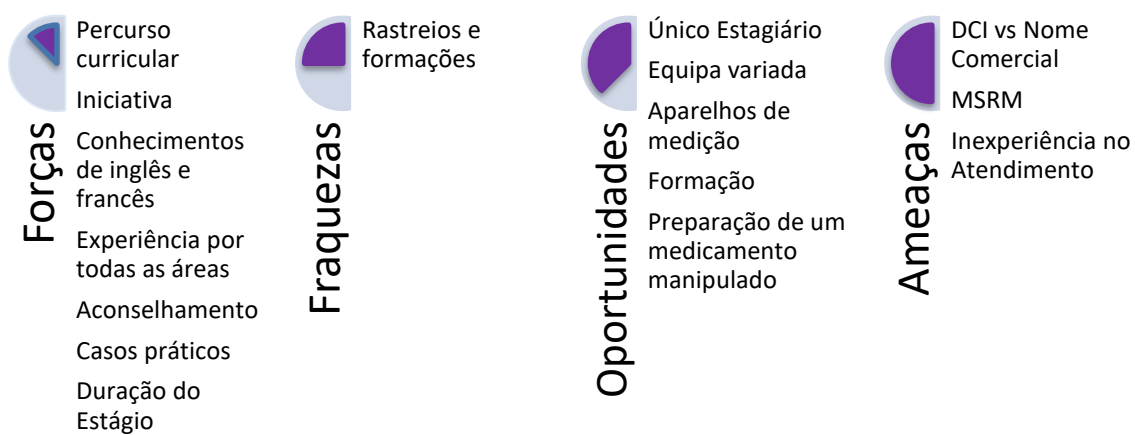


Figura 4 - Esquema resumo da Análise SWOT.

3.3. Papel do farmacêutico

A farmácia comunitária é uma das áreas de competência farmacêutica em que o contacto com o doente é o mais frequente e dos mais significativos. É dever do farmacêutico assegurar a qualidade do medicamento e do seu circuito, o que implica a presença deste nas várias etapas, desde a investigação de um novo fármaco à sua utilização como medicamento. Todavia, o culminar deste processo é o contato direto com o doente. Só na FC o farmacêutico acompanha de perto o utente, auxiliando-o na adesão à terapêutica, assegurando desta forma, o sucesso da mesma.

3.4. Conclusão

Durante o meu percurso académico sempre me pareceram claros dois aspetos: que poderia optar por uma carreira em qualquer área farmacêutica e que, para me tornar farmacêutica, teria de passar por uma experiência em FC. Devo admitir que inicialmente receava a última ideia. O curso prepara-nos com a bagagem técnico-científica adequada, mas não para lidar com as situações do quotidiano.

Graças à ajuda da restante equipa da farmácia, consegui ultrapassar esses medos. Os relatos das suas experiências, a sua empatia e simpatia encorajaram-me a enfrentar todas as situações. A sua ajuda imprescindível ensinou-me a cada dia como proceder e como a realidade de um farmacêutico de comunitária se relaciona com o seu papel de agente de saúde pública. Consegui aprender a comunicar, exercer o meu papel e a ser uma boa influência na vida dos utentes com que contactei. Pude aperfeiçoar o meu conhecimento e adaptá-lo à população e aos seus problemas. Por fim, consegui ultrapassar receios iniciais e fazer um bom trabalho.

Agradeço, assim, a oportunidade que me foi concedida de poder ultrapassar as minhas inseguranças no melhor ambiente possível e com os melhores profissionais. Esta experiência faz-me crer que de futuro estarei preparada para lidar, pessoalmente e profissionalmente, com o que significa ser uma farmacêutica e contribuir para uma melhor saúde pública.

4. Bibliografia

1. Miller, L. *et al.* - **Diagnosis of Plasmodium falciparum infections in mummies using the rapid manual ParaSight-F test.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 88 (1994) 31-32.
2. Hawass, Z. *et al.* - **Ancestry and Pathology in King Tutankhamun's Family.** American Medical Association, 303 (2010) 638–647.
3. Cox, F. – **History of the discovery of the malaria parasites and their vectors.** Parasites & Vectors, 3 (2010) 5.
4. World Health Organization – **World Malaria Report 2016.** 1° Ed. Geneva: World Malaria Report, 2016. ISBN 978-92-4-151171-1.
5. Aditya, N. *et al.* – **Advances in nanomedicines for malaria treatment.** Advances in Colloid and Interface Science, 201-202 (2013) 1-17.
6. Cowman, A. *et al.* – **Malaria: Biology and Disease.** Cell, 167 (2016) 610-624.
7. Rodrigues, C. *et al.* – **Host Scavenger Receptor SR-BI Plays a Dual Role in the Establishment of Malaria Parasite Liver Infection.** Cell Host & Microbe, 4 (2008) 271-282.
8. Sturm, A. *et al.* – **Manipulation of Host Hepatocytes by the Malaria Parasite for Delivery into Liver Sinusoids.** Science, 313 (2006) 1287-1290.
9. Riglar, T. *et al.* – **Super-Resolution Dissection of Coordinated Events during Malaria Parasite Invasion of the Human Erythrocyte.** Cell Host & Microbe, 9 (2011) 9-20.
10. Ginsburg, H.; Stein, W. – **New Permeability Pathways Induced by the Malarial Parasite in the Membrane of its Host Erythrocyte: Potential Routes for Targeting of Drugs into Infected Cells.** Bioscience Reports, 7 (1987) 455-463.
11. Mantel, P. Y. *et al.* **Malaria-infected Erythrocyte-Derived Microvesicles Mediate Cellular Communication within the Parasite Population and with the Host Immune System.** Cell Host & Microbe, 13 (2013) 521–534.
12. Regev-Rudzki, N. *et al.* - **Cell-Cell Communication Between Malaria-Infected Red Blood Cells via Exosome-like Vesicles.** Cell, 43 (2011) 1120-1133.
13. Tilley, L.; Dixon, M.; Kirk, K. – **The Plasmodium falciparum-infected red blood cell.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 43 (2011) 839-842.
14. Nunes-Silva, S. *et al.* - **Beninese children with cerebral malaria do not develop humoral immunity against the IT4-VARI9-DC8 PfEMP1 variant linked to EPCR and brain endothelial binding.** Malaria Journal, 14 (2015) 493.

15. Cunnington, A.; Walther, M.; Riley, E. – **Piecing Together the Puzzle of Severe Malaria.** *Science Translational Medicine*, 5 (2013) 296-300.
16. World Health Organization. **Guidelines for the Treatment of Malaria.** 3ª Edição. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2015. ISBN 978-92-4-154912-7.
17. Wassmer, S. *et al* - **Investigating the Pathogenesis of Severe Malaria: A Multidisciplinary and Cross-Geographical Approach.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93 (2015) 42-56.
18. Cohen, S.; McGregor, I.; Carrington, S. – **Gamma-Globulin and Acquired Immunity to Human Malaria.** *Nature*, 25 (1961) 733-737.
19. Bull, P. *et al* – **Parasite antigens on the infected red cell surface are targets for naturally acquired immunity to malaria.** *Nature Medicine*, 4 (1998) 358-360.
20. World Health Organization. *Weekly epidemiological record.* Vol 91, nº 3 (22 Janeiro 2016), 21-32.
21. Sinha, S.; Medhi, B.; Sehgal, R. – **Challenges of drug-resistant malaria.** *Parasite*, 21 (2014) 61.
22. Taylor, T.; Molyneux, M. - **The pathogenesis of pediatric cerebral malaria: Eye exams, autopsies, and neuroimaging.** *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1342 (2015) 44-52.
23. Marsh, K. *et al* – **Indicators of Life-Threatening Malaria in African Children.** *The New England Journal of Medicine*, 332 (1995) 1399-1404.
24. Brewster, D.; Kwiatkowski, D.; White, N. – **Neurological sequelae of cerebral malaria in children.** *The Lancet*, 336 (1990) 1039-1043.
25. Marijon, A. *et al* - **Efficacy of intranasal administration of artesunate in experimental cerebral malaria.** *Malaria Journal*, 13 (2014) 501.
26. Medana, I. *et al* – **Coma in fatal adult human malaria is not caused by cerebral oedema.** *Malaria Journal*, 10 (2011) 267.
27. Brown, H. *et al* – **Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria.** *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 25 (1999) 331-340.
28. Touitou, E. *et al* – **Treatment of malaria in a mouse model by intranasal drug administration.** *International Journal for Parasitology*, 36 (2006) 1493-1498.
29. Rénia, L.; Howland, S.W. – **Targeting of the olfactory bulb during experimental cerebral malaria.** *Trends in Parasitology*, 30 (2014) 375-376.

30. Ponsford, M. *et al* - **Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria.** The Journal of Infectious Diseases, 4 (2012) 663-671.
31. Dondorp, A. *et al* – **Estimation of the Total Parasite Biomass in Acute Falciparum Malaria From Plasma PfHRP2.** PLoS Medicine, 2 (2005) 0788-0797.
32. Hendriken, I. *et al* - **Diagnosing Severe Falciparum Malaria in Parasitaemic African Children: A Prospective Evaluation of Plasma PfHRP2 Measurement.** PLoS Medicine, 9 (2012) 1-10.
33. D’Alessandro, U.; Buttiëns, H. – **History and importance of antimalarial drug resistance.** Tropical Medicine and International Health, 6 (2001) 845-848.
34. World Health Organization – **Artemisinin and artemisinin-based combination therapy resistance.** Global Malaria Programme, 2016. [Acedido a 31 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.who.int>
35. Newman, D.; Cragg, G. – **Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014.** Journal of Natural Products, 79 (2016) 629-661.
36. Bero, J.; Frédérich, M.; Quetin-Leclercq, J. – **Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine.** The Journal of Pharmacy and Pharmacology, 61 (2009) 1401-1433.
37. Klayman, D. - **Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China.** Science, 228 (1985) 1049-1055.
38. Tarkan, P. A. *et al* – **Application of multi-target phytotherapeutic concept in malaria drug discovery: a systems biology approach in biomarker identification.** Biomarker Research, 4 (2016) 25.
39. International Union for Conservation of Nature – **The IUCN Red list of Threatened Species: *Poupartia borbonica*.** [Acedido a 31 Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.iucnredlist.org>
40. Ministère de l’Écologie, du Développement durable et de l’Énergie – **Plan National d’Action du Bois Blanc Rouge: *Poupartia borbonica* 2012-2016.** Réunion: Conservatoire Botanique National de Mascarin, 2011.
41. Mitchell, J.; Daly, D. – **A revision of *Spondias* L. (Anacardiaceae) in the Neotropics.** PhytoKeys, 92 (2015) 1-92.
42. Lavergne, R.; Véra, R. – **Étude ethnobotanique des plantes utilisées dans la pharmacopée traditionnelle à La Réunion.** 1^o Ed. Saint-Étienne: Agence de Coopération Culturelle et Technique, 1989. ISBN 92-9028 150.2

43. Adersen, A.; Adersen, H. - **Plants from Reunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects - an experimental and ethnobotanical evaluation.** Journal of Ethno-Pharmacology, 58 (1997) 189-206.
44. Lavergne, R. - **Les plantes médicinales réunionnaises d'aujourd'hui.** 1^a Ed. Chevagny sur Guye: Orphie, 2004. ISBN: 978-2-87763-671-1
45. Ledoux, A. *Et al* - **Antimalarial Activities of Alkyl Cyclohexenone Derivatives Isolated from the Leaves of *Poupartia borbonica*.** Journal of Natural Products, 80 (2017) 1750-1757.
46. Roumy, V. *e al* - **Isolation and Antimalarial Activity of Alkaloids from *Pseudoxandra cuspidate*.** - Planta Medica, 72 (2006) 894-898.
47. McCollum, C. *et al* - **Developmental Toxicity Screening in Zebrafish.** Birth Defects Research Part C Embryo Today Reviews, 93 (2011) 67-114.
48. Samad, A.; Sultana, Y.; Aqil, M. - **Liposomal Drug Delivery Systems: Na Update Review.** Current Drug Delivery, 4 (2007) 297-305.
49. Daraee, H. *et al* - **Application of liposomes in medicine and drug delivery.** Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 44 (2016) 381-391.
50. Bozzuto, G.; Molinari, A. - **Liposomes as nanomedical devices.** International Journal of Nanomedicine, 10 (2015) 975-999.
51. Lai, F.; Fadda, A.; Sinico, C. - **Liposomes for brain delivery.** Expert Opinion on Drug Delivery, 10 (2013) 1003-1022.
52. Alexander, A. *et al* - **Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives.** Journal of Controlled Release, 241 (2016) 110-124.
53. Duehrkop, C. *et al.* **Development and characterization of an innovative heparin coating to stabilize and protect liposomes against adverse immune reactions.** Colloids Surfaces B: Biointerfaces, 141 (2016) 576-583.
54. Hee Kang, J.; Young Jang, W.; Tag Ko, Y. - **The Effect of Surface Charges on the Cellular Uptake of Liposomes Investigated by Live Cell Imaging.** Pharmaceutical Research, 34 (2017) 704-717.
55. Köse, G.; Arica, M.; Hasirci, V. - **Low-Molecular-Weight Heparin-Conjugated Liposomes with Improved Stability and Hemocompatibility.** Drug Delivery, 5 (1998) 257-264.
56. Türker, S.; Onur, E.; Özer, Y. - **Nasal route and drug delivery systems.** Pharmacy World and Science, 26 (2004) 137-142.

57. Mistry, A.; Stolnik, S.; Illum, L. - **Nanoparticles for direct nose-to-brain delivery of drugs**. *International Journal of Pharmaceutics*, 379 (2009) 146-157.
58. Ali, J. *et al* - **Potential of nanoparticulate drug delivery systems by intranasal administration**. *Current Pharmaceutical Design*, 16 (2010) 1644-1653.
59. Illum, L. - **Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11 (2000) 1-18.
60. Migliore, M. *et al* - **Brain delivery of proteins by the intranasal route of administration: A comparison of cationic liposomes versus aqueous solution formulations**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99 (2010) 1745-1761.
61. Marques, J. *et al* - **Application of heparin as a dual agent with antimalarial and liposome targeting activities toward Plasmodium-infected red blood cells**. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10 (2014) 1719-1728.
62. Zhang, Y. *et al* - **Proteomic analysis of Plasmodium falciparum schizonts reveals heparin-binding merozoite proteins**. *Journal of Proteome Research*, 12 (2013) 2185-2193.
63. Xiao, L. *et al* - **Sulfated polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodial merozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes**. *Infection and Immunity*, 64 (1996) 1373-1378.
64. Juillerat, A. *et al* - **Biochemical and biophysical characterisation of DBL1 α 1-varO, the rosetting domain of PfEMPI from the VarO line of Plasmodium falciparum**. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 170 (2010) 84-92.
65. Rathore, D. McCutchan, T. - **Heparin can regulate the binding of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein**. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 108 (2000) 253-256.
66. Bian, W.; Pei, D. – **Chapter 25: Zebrafish Model for Safety and Toxicity Testing of Nutraceuticals**. In: Gupta, R. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*. Oxford: Elsevier, 2016. ISBN 978-0-12-802147-7, 333-339.
67. Shaukat, A.; Harald, G. J.; Richardson, M. – **Large-Scale Assessment of the Zebrafish Embryo as a Possible Predictive Model in Toxicity Testing**. *PLoS ONE*, 6 (2011) 1-11.
68. Trager, W.; Jensen, J.B. – **Human malaria parasite in continuous culture**. *Science*, 193 (1976) 673-675.
69. PORTUGAL. **Decreto-Lei n.º 318/2009 de 2 de Novembro**. *Diário da República*, Ministério da Saúde, Lisboa, 2009.
70. Site <http://www.ulsqb.min-saude.pt/>, acessido a 13/05/2017 às 11h30.

71. PORTUGAL. **Despacho n.º 2325/2017 – Regulamento das Comissões de Farmácia e Terapêutica (CFT) das unidades hospitalares**, *Diário da República n.º 55*, II Série, Saúde – Gabinete do Ministro, Lisboa, 2017.
72. PORTUGAL. **Deliberação n.º 1546/2015 de 6 de Agosto**. *Diário da República n.º 152*, II Série, INFARMED — Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P., Lisboa, 2015.
73. PORTUGAL. **Portaria n.º 48/2016 de 22 de Março**. *Diário da República n.º 57*, I Série, Ministério da Saúde, Lisboa, 2016.
74. PORTUGAL. **Decreto-Lei n.º 13/2009 de 12 de Janeiro**. *Diário da República n.º 7*, I Série, Ministério da Saúde, Lisboa, 2009.
75. PORTUGAL. **Despacho 18419/2010 de 13 de Dezembro**. *Diário da República n.º 239*, II Série, Ministério da Saúde, Lisboa, 2010.
76. Conselho Executivo da Farmácia Hospitalar, **Manual da Farmácia Hospitalar**. Ministério da Saúde, 2005. [Acedido a 06 de Agosto de 2017]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/>
77. PORTUGAL. **Despacho n.º 13382/2012 de 4 de Outubro – Determina que a Prescrição de medicamentos, para dispensa em regime de ambulatório pelas farmácias hospitalares, é obrigatoriamente realizada através de sistemas de prescrição eletrónica**, *Diário da República n.º 198*, II Série, Saúde – Gabinete do Ministro, Lisboa, 2012.
78. PORTUGAL. **Despacho n.º 1051/2000 de 30 de Outubro**. *Diário da República n.º 251*, II Série, Ministério da Saúde, Lisboa, 2000.
79. Pina, D., *et all*, **Procedimento De Distribuição De Hemoderivados No Centro Hospitalar De São João, EPE.**, Livro De Actas Do VIII Colóquio De Farmácia, 39-43, Vila Nova de Gaia, 2012.
80. Conselho do Colégio da Especialidade de Farmácia Hospitalar, **Boas Práticas de Farmácia Hospitalar**, 1ª Edição, Ordem dos Farmacêuticos, 1999. ISBN: 972-96555-2-9.
81. Conselho do Colégio de Especialidade de Farmácia Hospitalar, **Manual de Preparação de Citotóxicos**, 1ª Edição, Ordem dos Farmacêuticos, 2013. ISBN: 978-989-98069-2-4.
82. PORTUGAL. **Portaria n.º 348/98 de 15 de Junho**. *Diário da República n.º 10*, II Série, INFARMED — Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P., Lisboa, 2011.
83. PORTUGAL. **Decreto-Lei n.º 242/2002 de 5 de Novembro**. *Diário da República n.º 255*, I Série, Ministério da Saúde, Lisboa, 2002.

84. PORTUGAL. **Lei n. ° 73/2015 de 27 de Julho.** *Diário da República n. ° 144*, I Série, Assembleia da República, Lisboa, 2015.
85. PORTUGAL. **Portaria n. ° 981/98 de 8 de Junho.** *Diário da República n. ° 216*, II Série, Ministério da Saúde, Lisboa, 1998.
86. PORTUGAL. **Circular Informativa n. ° 166/CD/100.20.200 – Registo de psicotrópicos e estupefacientes,** INFARMED — Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P., Lisboa, 2015.
87. PORTUGAL. **Norma n. ° 020/2014 – Medicamentos com nome ortográfico, fonético ou aspeto semelhantes,** Direção-Geral da Saúde, Lisboa, 2015.
88. PORTUGAL. **Norma n. ° 006/2013 – Programa Nacional de Eliminação do Sarampo,** Direção-Geral da Saúde, Lisboa, 2013.
89. PORTUGAL. **Norma 016/2016 – Programa Nacional de Vacinação 2017,** Direção-Geral da Saúde, Lisboa, 2016.
90. PORTUGAL. **Norma 004/2017 – SARAMPO: Procedimentos em unidades de saúde – Programa Nacional Eliminação Sarampo,** Direção-Geral da Saúde, Lisboa, 2017.
91. PORTUGAL. **Norma 018/2016 – Reconciliação da medicação,** Direção-Geral da Saúde, Lisboa, 2016.
92. Site <http://intranet.hal.min-saude.pt/index.php>, acessido a 20/05/2017 às 17h.
93. PORTUGAL. **Decreto-Lei n. ° 20/2013 de 14 de Fevereiro,** INFARMED — Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P., Lisboa, 2013.
94. INFARMED – **Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos.** 9ª Ed. Lisboa: Ministério da Saúde, 2006. ISBN 972-8425-71-6.
95. INFARMED – **Farmacopeia Portuguesa.** 9ª Ed. Lisboa: INFARMED, 2009. ISBN 978-972-8425-96-8.
96. PORTUGAL. **Decreto-Lei n.º 74/2006 de 24 de março.** *Diário da República n. ° 60*, I Série, Ministério da Saúde, Lisboa, 2006.
97. PORTUGAL. **Lei n.º 131/2015 de 4 de setembro.** *Diário da República n.º 173*, I Série, Assembleia da República, Lisboa, 2015.
98. PORTUGAL. **Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de agosto.** *Diário da República n. ° 167*, I Série, Ministério da Saúde, Lisboa, 2006.
99. Informação sobre *Medical Dispenser*®. Disponível na Internet: <http://www.fagorhealthcare.com>
100. Informação sobre Unguator®. Disponível na internet: <https://www.unguator.com>

101. POTUGAL. **Portaria n. ° 769/2004 de 1 de julho.** *Diário da República n. ° 153, I Série*, Ministérios da Economia e da Saúde, Lisboa, 2004.
102. PORTUGAL. **Despacho n. ° 18694/2010 de 16 de dezembro.** *Diário da República n. ° 242, II Série*, Ministério da Saúde, Lisboa, 2010.
103. Carmona, M *et all* – **Prontuário Terapêutico.** INFARMED, 2016. [acedido a 17 de agosto de 2017]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/documentacao_e_informacao/publicacoes/prontuario-terapeutico.

5. Anexos

Anexo I

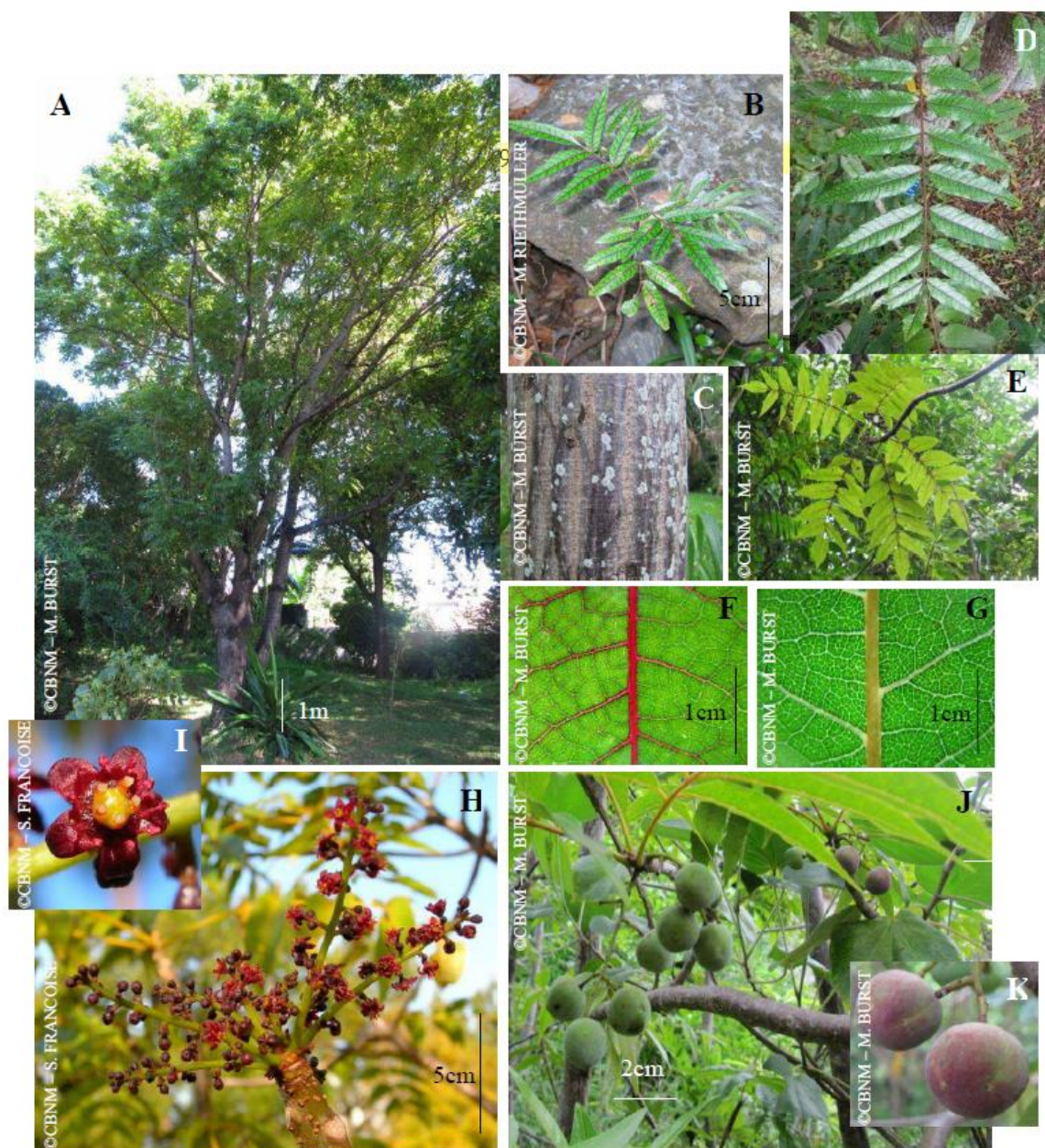


Figure I - Presentation of *Poupartia borbonica*: (A) usual height, (B) plantule, (C) bark, (D) juvenile leaves, (E) transition leaves, (F) detail of a juvenile leaf, (G) detail of an adult leaf, (H) branch with inflorescences, (I) female flower, (J) immature fruits, (K) mature fruits. In Lavergne, C. & Burst, M. Plan National d'Action du Bois Blanc Rouge (*P. borbonica*). Rapp. Serv. Eau Biodiversité, Unité Biodiversité, Ministère l'Écologie, du Développement durable l'Énergie, II (2011).

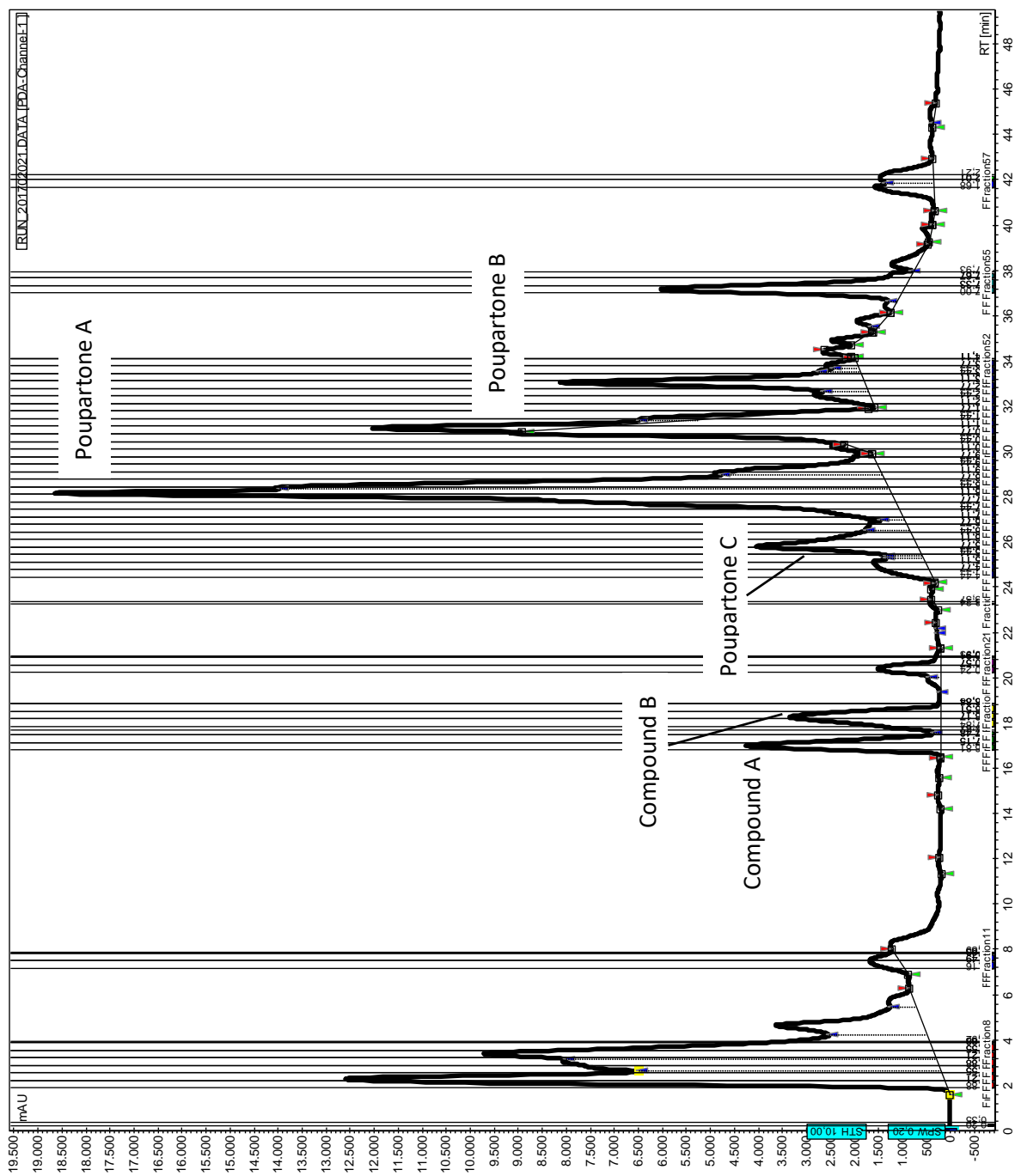


Figure I - Preparative HPLC specter.

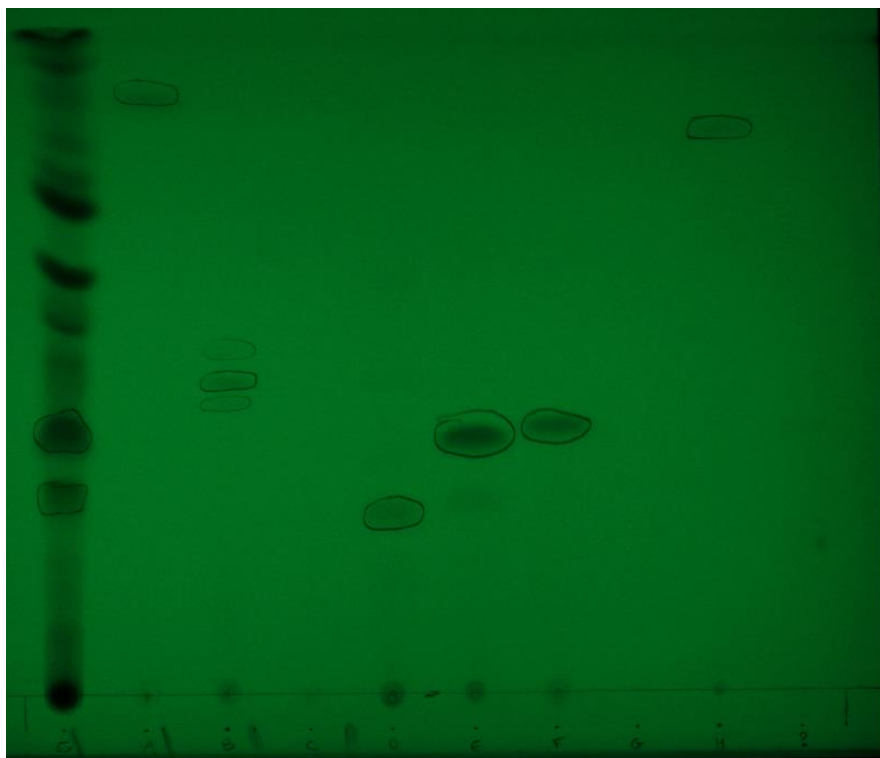


Figure 1 - TLC plate under UV light at 254 nm. C_x – Control, A – Compound A, B – Compound B and B_{Down} under it, C – Compound C, D – Poupartone C, E – Poupartone A, F – Poupartone B, G – Compound G, H – Compound H.

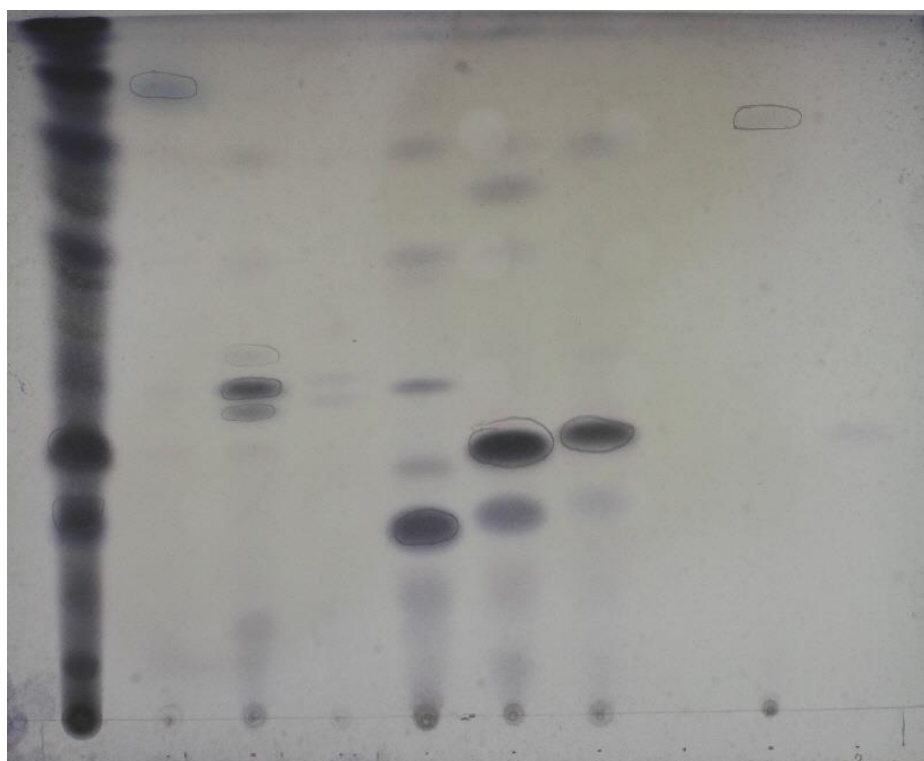


Figure 2 - TLC plate after revelation. CX – Control, A – Compound A, B – Compound B and B_{Down} under it, C – Compound C, D – Poupartone C, E – Poupartone A, F – Poupartone B, G – Compound G, H – Compound H.

Anexo IV

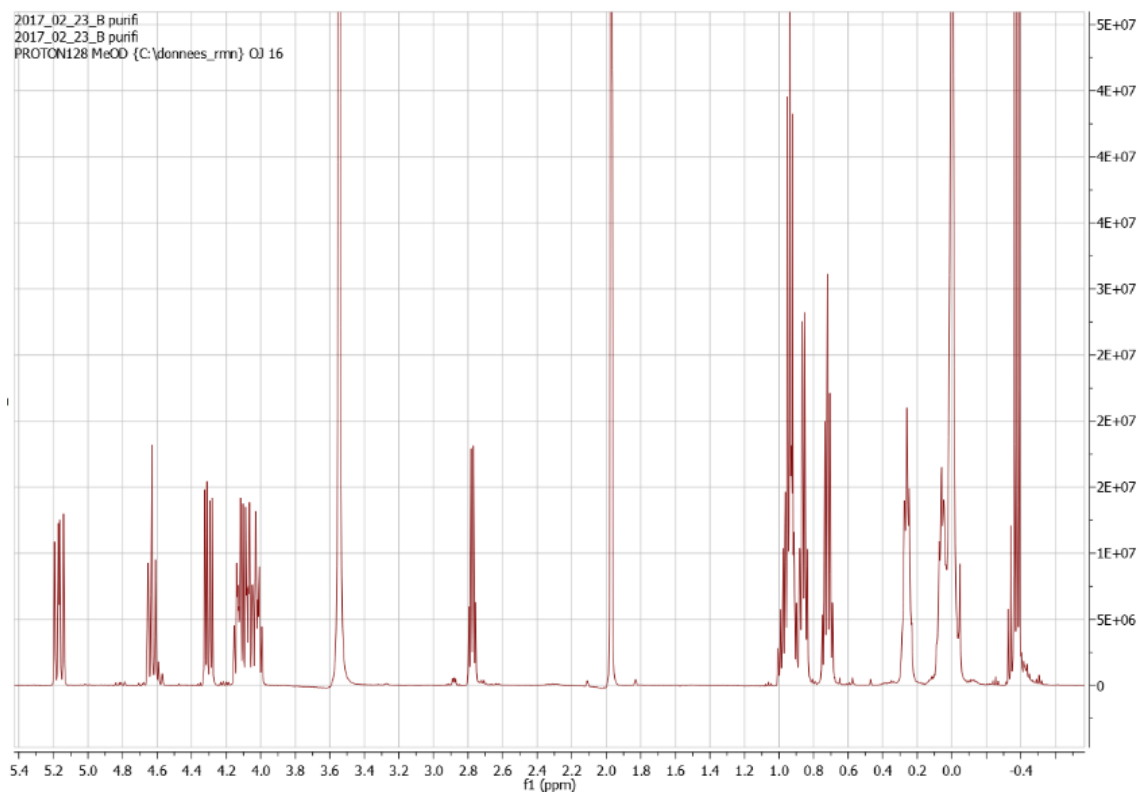


Figure 1 – ¹H NMR spectra of Compound B.

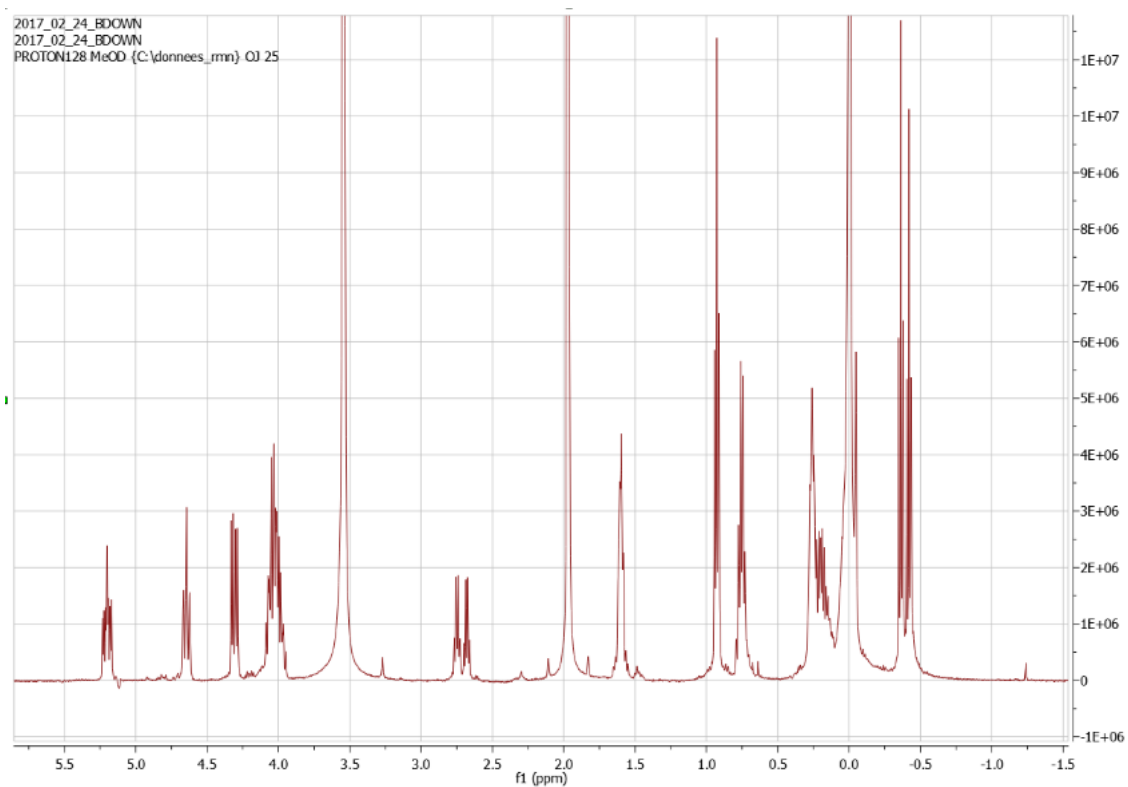


Figure 2 - ¹H NMR spectra of Compound B_{Down}.

Anexo V

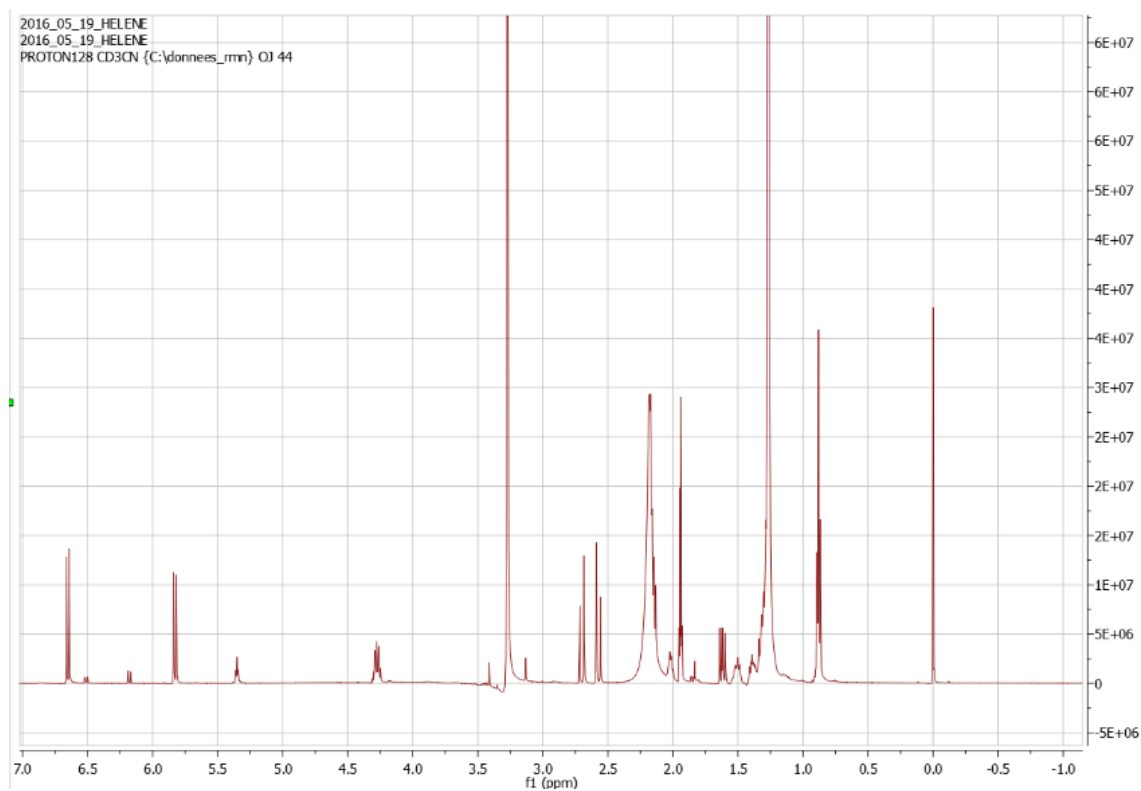


Figure I - ^1H NMR spectra of Poupartone B.

Anexo VI

Table I – Validation results of the liposomes and quantification of Poupartone B and the Entrapment Efficacy (EE)

Lot		Size (dnm)	PDI	Charge (mV)	Concentration of Poupartone B (µg/ml)	EE (%)
20170117	Without heparin	207.1	0.098	22.4	-	-
	With heparin	242.0	0.500	17.3	-	-
20170124	Without heparin	-	-	-	-	-
	With heparin	193.3	0.195	-19	136.5	13.65
20170130	See Anexo VII					
20170302	Without heparin	165.4	0.105	32.1	-	-
	With heparin	226.6	0.253	28.1	342.5	17.13
20170306	Without heparin	275.6	0.247	29.3	-	-
	With heparin	209.8	0.200	25.8	805.78	40.29
20170320 with Poupartone B	Without heparin	213.0	0.205	19.1	-	-
	With heparin	282.7	0.300	13.8	216.0	10.8
20170320 without Poupartone B	Without heparin	190.7	0.203	36.9	-	-
	With heparin	200.6	0.150	31.2	-	-

Entrapment efficiency gives an idea about the percentage of drug that is successfully entrapped/adsorbed into nanoparticles. It is calculated as follows:

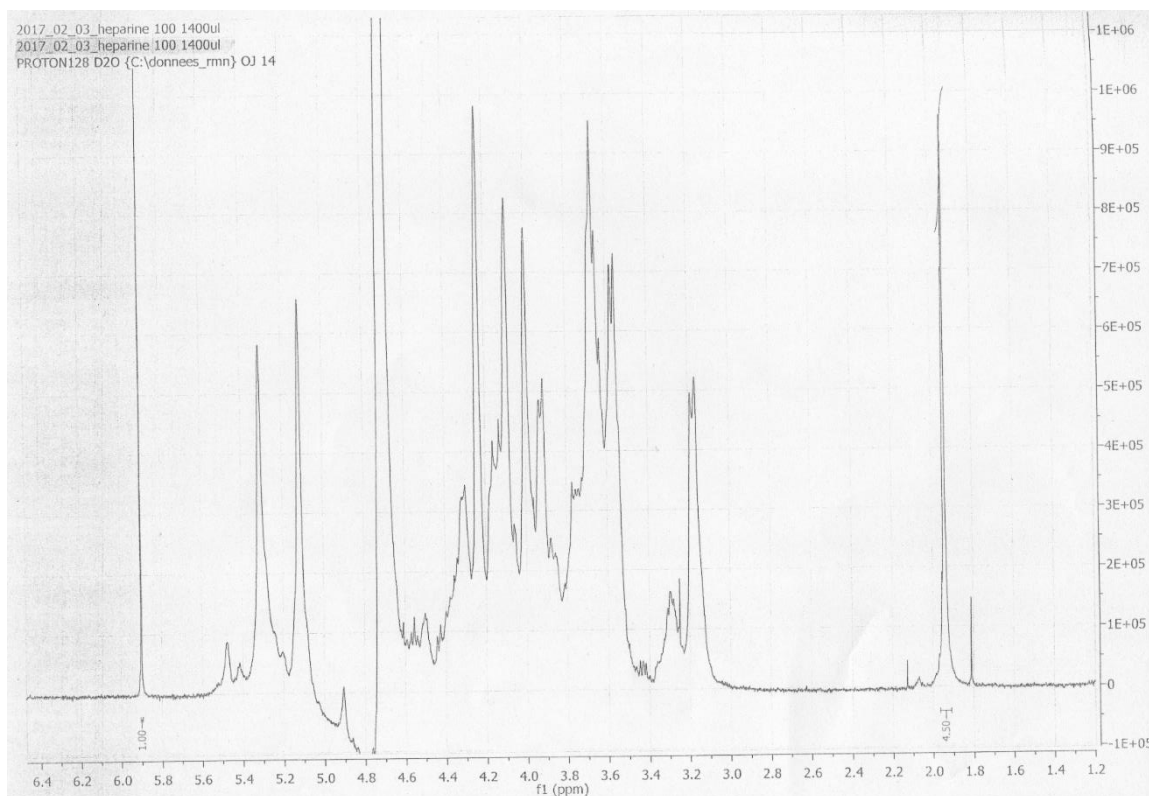
$$EE(\%) = \frac{\text{Drug added} - \text{Free untrapped drug}}{\text{Drug added}} \times 100$$

Anexo VII

Table I - Stability Parameters of the Liposomes

Lot		Size (dnm)		PDI		Charge (mV)		Concentration of Poupartone B (µg/ml)		EE (%)	
		0	8	0	8	0	8	0	8	0	8
Allison	Without heparin	204,0	-	0,17	-	15.4	-	-	-	-	-
	With heparin	137.0	254.6	0.2	0.16	12.8	16	281.85	269.00	28.19	26.9
Lúcia	Without heparin	168.6	-	0.099	-	17.8	-	-	-	-	-
	With heparin	210.0	257.1	0.37	0.249	10.8	12.4	469.15	436.8	46.92	43.68

Anexo VIII



Graphic I - ^1H NMR specter of the heparin pattern solution.

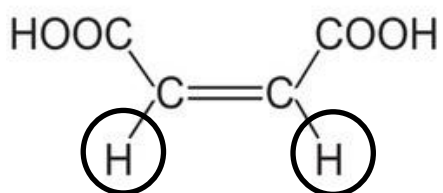


Figure I - Molecular structure of the maleic acid. The circled protons are responsible for the pic at 6 ppm in the Graphic I.

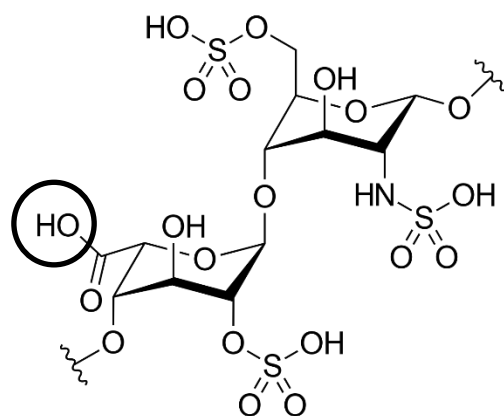
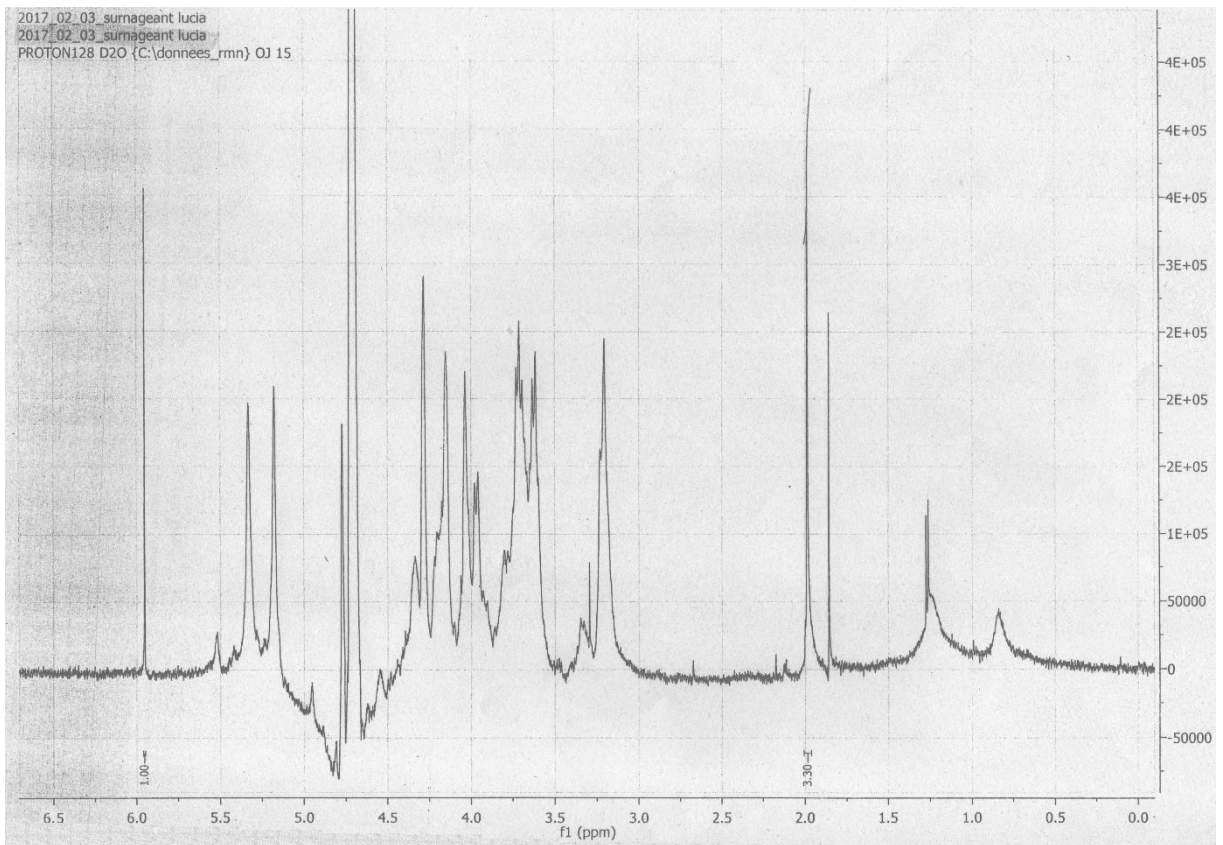
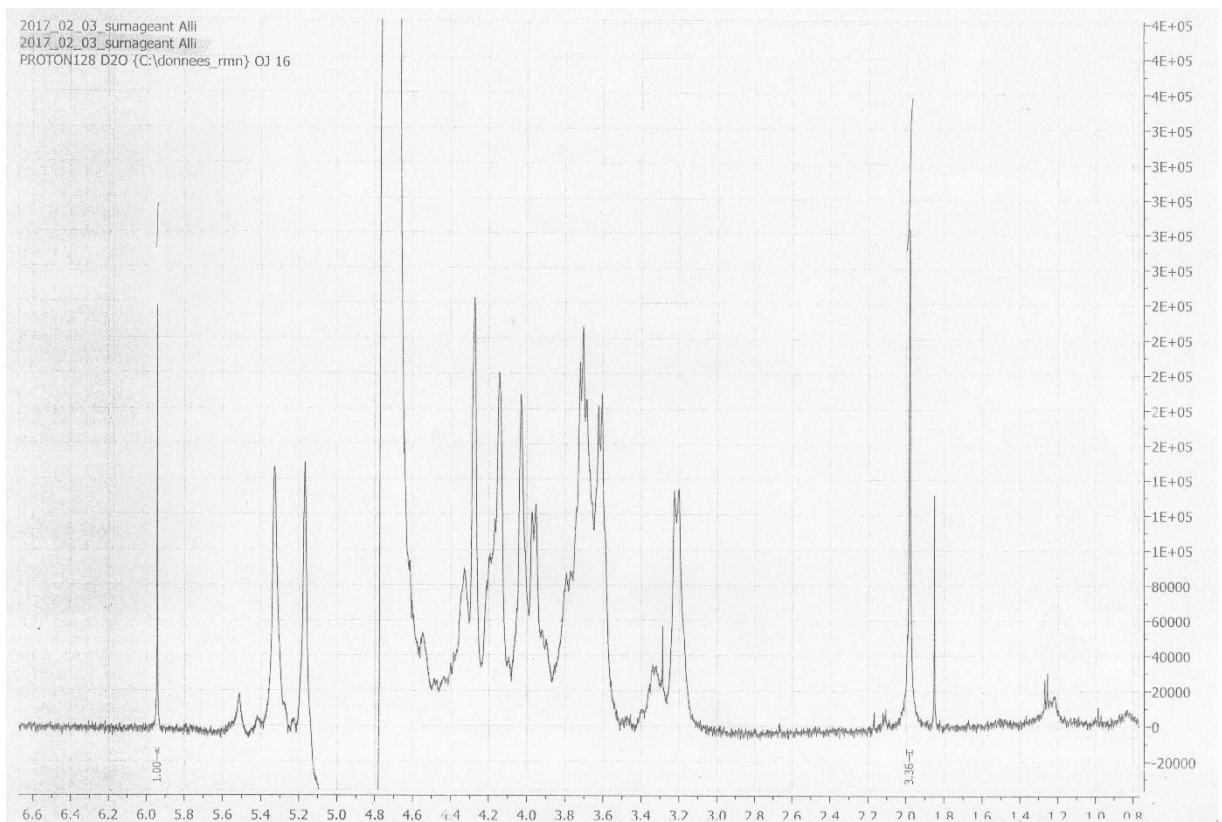


Figure 2 - Molecular structure of the heparin. The circled proton is responsible for the pic at 1.9 ppm in the Graphic I.



Graphic 2 - ^1H NMR spectrum of the supernatant of Lúcia's liposomes.



Graphic 3 - ^1H NMR spectrum of the supernatant of Allison's liposomes.

Anexo IX

Table I – Table of validation results.

Validation standards or QC samples				
Sample ID	Series	Level	Concentration	Response
BV1	1	10,00000	10,00000	14,2
BV2	1	10,00000	10,00000	14,1
BV3	1	10,00000	10,00000	14,4
CV1	1	20,00000	20,00000	29,5
CV2	1	20,00000	20,00000	29,5
CV3	1	20,00000	20,00000	29,9
DV1	1	50,00000	50,00000	70,0
DV2	1	50,00000	50,00000	72,1
DV3	1	50,00000	50,00000	69,9
EVI	1	100,00000	100,00000	146,3
EV2	1	100,00000	100,00000	145,9
EV3	1	100,00000	100,00000	144,0
BV1	2	10,00000	10,00000	13,6
BV2	2	10,00000	10,00000	13,0
BV3	2	10,00000	10,00000	13,6
CV1	2	20,00000	20,00000	29,5
CV2	2	20,00000	20,00000	28,6
CV3	2	20,00000	20,00000	28,6
DV1	2	50,00000	50,00000	70,9
DV2	2	50,00000	50,00000	70,0
DV3	2	50,00000	50,00000	69,6
EVI	2	100,00000	100,00000	147,3
EV2	2	100,00000	100,00000	145,3
EV3	2	100,00000	100,00000	148,1

Anexo X

Illustrations taken from the validation report.

Figure 2 - Accuracy profile obtained by considering Linear Regression

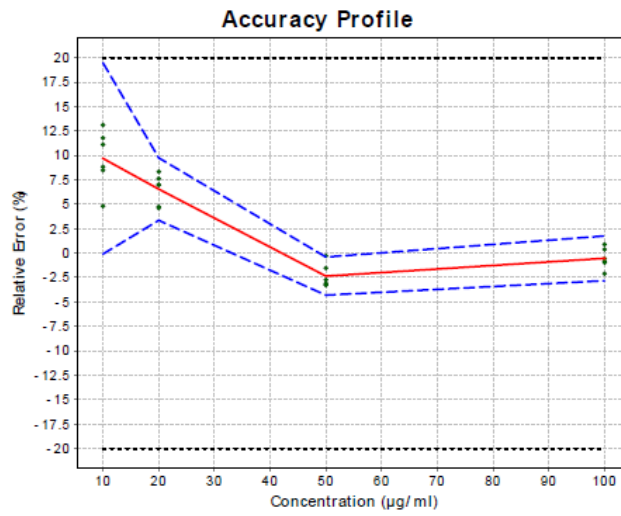


Figure 3 - Risk profile obtained by considering Linear Regression

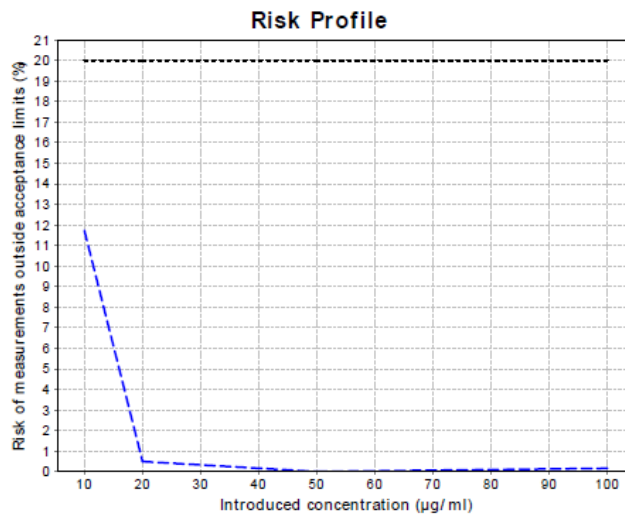
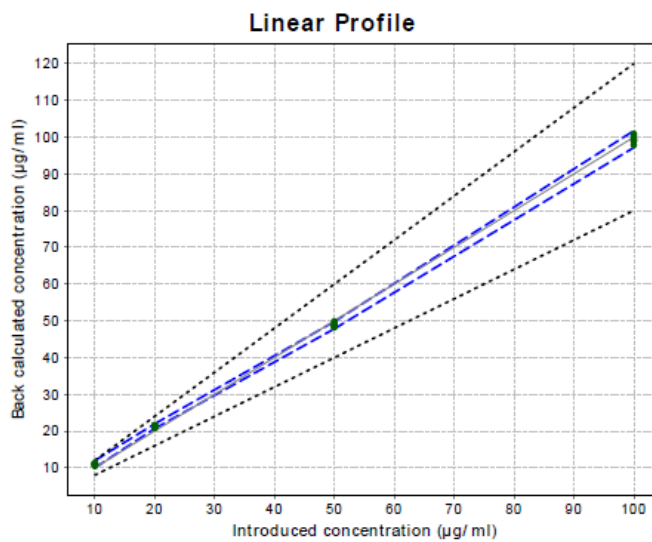


Figure 5 - Linearity graph



Anexo XI

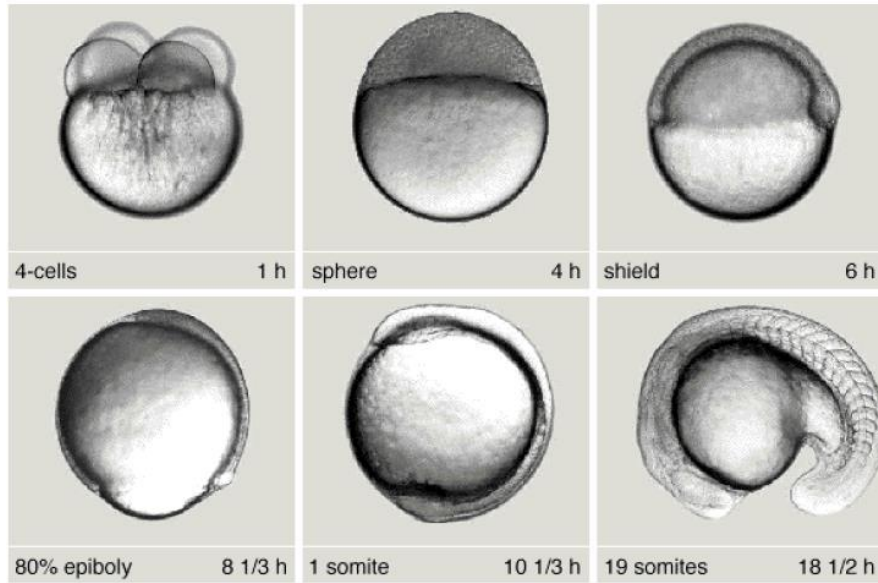


Figure 1A

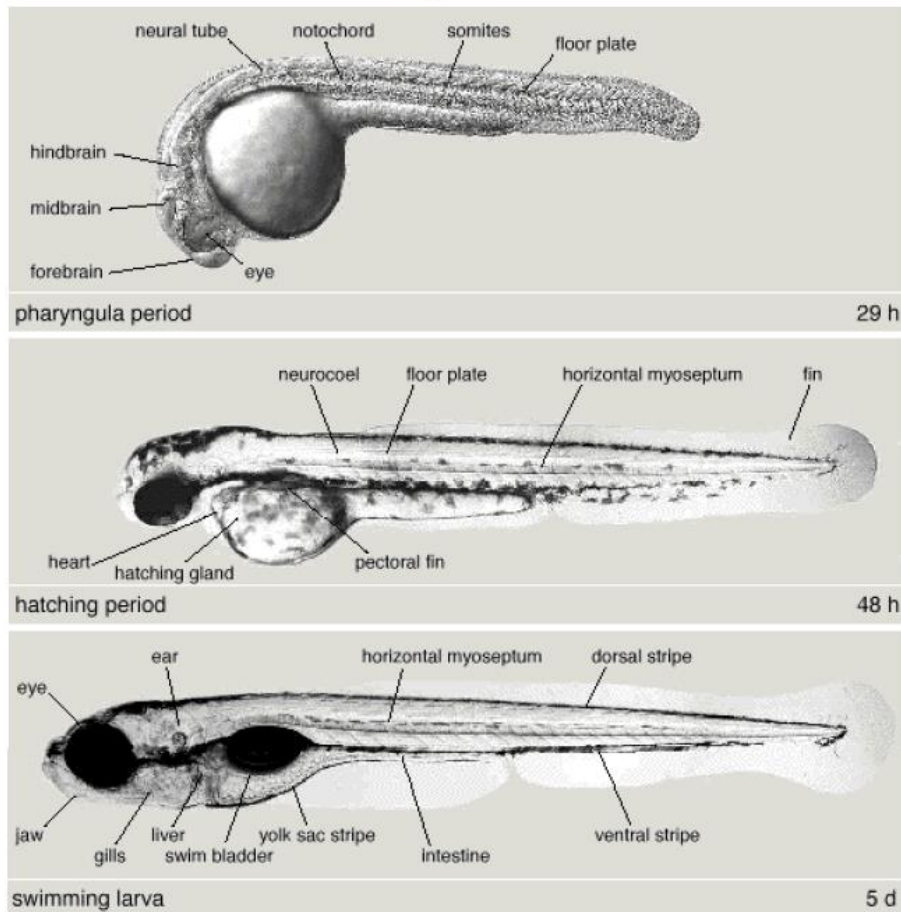


Figure 1B

Figure 1. Living zebrafish embryos. (A) The first 24 hours of development. (B) Embryos at 29 hours, 48 hours and 5 days of development. (From Haffter *et al.*, 1996. Reproduced with permission from The Company of Biologists.)

In Leon Browder et Laurie Iten (Ed.), *Dynamic Development: Why study zebrafish?*, Calgary: University of Calgary, 1998 [accessed 14 March 2017]. Available at: <http://www.ucalgary.ca/>

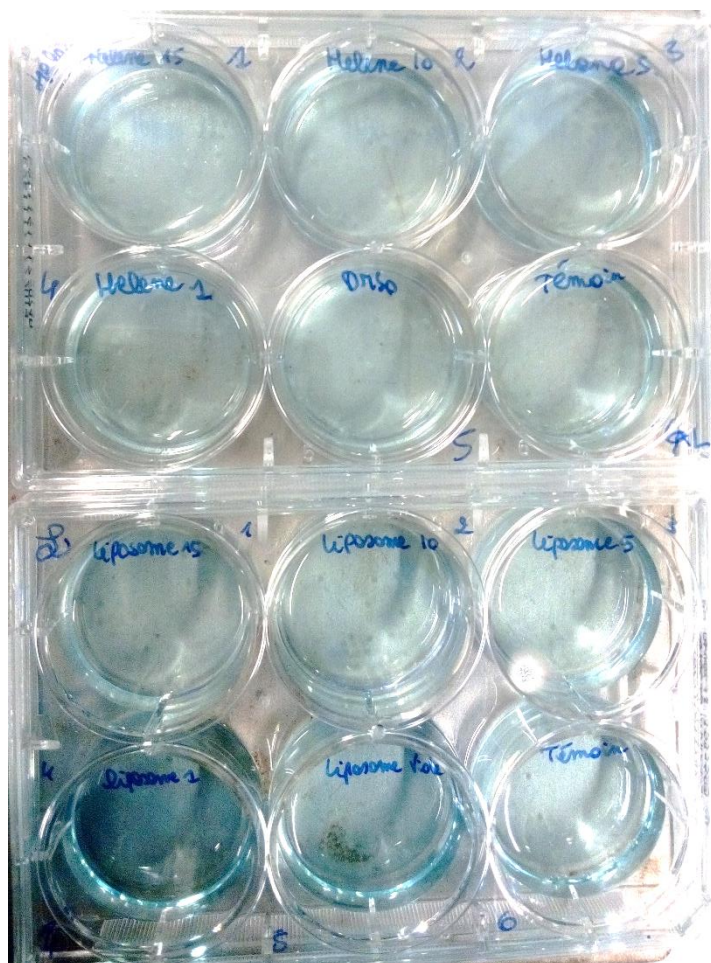


Figure 3 - Plate with wells with the zebrafish larvae.

Anexo XIII

Table I – Table of observations from the first zebrafish test – Poupartone B's Plate.

Plaque	Well	T ₀ *	T ₂₁		T ₂₅ *	T ₂₈	T ₄₅ *	T ₅₁	
Poupartone B	5 µg/ml	N = 15	8E + 7L	2 appear to have behavior problems (they move and shouldn't). The heartbeat is a blood passage on the tail is slow. Tail shows signs of necrosis.	All with abnormal tail, heart and movements. 7L/8L with heart failure	All with tail necrosis and slow heartbeat.	1E dead. 2L with morphological problems. 7L w/ smaller brain. All shorter than normal. Blood circulation stable.	Maintained.	
	3.3 µg/ml	N = 12	11E/1L	Appear normal.	Slow heartbeat	All with slow heartbeat. Less extent of tail necrosis.	3E of which 1E is dead. All L have slow heartbeat and movement problems. 1 very short.	All dechorionated. Heartbeat normal.	
	2 µg/ml	N = 15	15E		Appear normal.	Appear normal.	Appear normal.	All dechorionated and well.	Maintained.
	1 µg/ml	N = 15	15E					2E and all well.	All dechorionated and well.
	DMSO	N = 15	15E					1L w/ heart edema.	Maintained.
	Negative	N = 15	15E					1E and 1L with slow heartbeat.	1L w/ heart edema.

* renovation of the mean with the according concentration

E - embryo

L - larva

Table 2 – Table of observations from the first zebrafish test – Plate with Liposomes with Poupartone B.

Plaque	Well	T ₀ *	T ₂₁		T ₂₅ *	T ₂₈	T ₄₅ *	T ₅₁
Liposomes	5 µg/ml	N = 15	15E	Appear normal.	All with normal heart. 2L/8L with abnormal movements. 1L/8L with abnormal tail.	2L with heart and tail problems.	The same 2L with problems. All dechorionated. A little shorter than normal, with a slightly smaller brain.	2L w/ abnormal behavior.
	3.3 µg/ml	N = 15	12E + 3 L	1L with morphological alterations	The same (1L/10L) with abnormal movements. All others normal.	The same is the only with problems.	The same with problems. All dechorionated and well.	Maintained.
	2 µg/ml	N = 17	14E + 3L	Appear normal.	Appear normal.	Appear normal.	1L with morphological problem.	Maintained.
	1 µg/ml	N = 14	13E + 1L				Appear normal.	
	DMSO	N = 15	13E + 2L					
	Negative	N = 15	15E					

* renovation of the mean with the according concentration

E - embryo

L - larva

Anexo XIV

Table I – Table of observations of the second zebrafish test – Poupartone B’s plate from T₁ to T₂₄.

Plaque	Well	Concentration	Number of Embryos	T ₁	T ₂₁	T ₂₄ *
Poupartone B	6	Negative	20	Ok. Photo 1	All E ok	-
	5	DMSO	20	Ok.	1/20E abnormal	-
	4	1 µg/ml	20	Ok.	1L w/abnormal movement 19E of different sizes but ok	-
	3	5 µg/ml	21	Chorion >> Slow movements in some	1L w/abnormal movement and spasms, very slow heartbeat and necrosis in the tail 20E ok	-
	2	10 µg/ml	20	Different sizes and movements	12L w/ slow heartrate, necrosis in the tail and abnormal movement and spasms 8E of different sizes, slow heartbeat. 1E abnormal	-
	1	15 µg/ml	21	Augmented size of the chorion	10L w/ tails w/ necrosis, very slow heartbeat and porous eyes 11E w/ different sizes	11E without circulation, slow hart with edema and hemorrhages, necrosis in the tail, small brains

* renovation of the mean with the according concentration

E - embryo

L - larva

Table 2 – Table of observations of the second zebrafish test – Liposome’s plate from T₁ to T₂₄.

	Well	Concentration	Number of Embryos	T ₁	T ₂₁	T ₂₄ *
Liposomes	6	Negative	22	They all look ok	All E. They don't move Eyes and defined tails	1L w/ circulation defects 21E ok
	5	Empty Liposomes	20		All E. 1 different.	3 L + 17E ok
	4	1 µg/ml	20		All E. All Ok.	1L + 19E ok
	3	5 µg/ml	21		3 L w/ abnormal movements, of which 2L ok and 1L with slow heartbeat and necrosis in the tail 2/18E abnormal tail	6L + 15E ok
	2	10 µg/ml	20		3L with abnormal movement. 1L with slow heartbeat and abnormal tail, 2L ok 2E with abnormal tail Other E ok	1/3L with abnormal movement 17E ok
	1	15 µg/ml	22		2/22E w/abnormal tail	3L, 2L ok and 1L with slow heartbeat, necrosis in the tail and abnormal movement 17 E with heart edema and no circulation in the tails

* renovation of the mean with the according concentration

E - embryo

L - larva

Table 3 – Table of observations of the second zebrafish test – Poupartone B’s plate from T₄₆ to T₅₂.

Plaque	Well	T ₂₇	T ₄₆	T ₄₈ *	T ₅₂
Poupartone B	6	19E + 1L ok	20L ok	-	Maintained
	5	17E ok 3L – 1 abnormal	2E abnormal, 1E dead 19L ok	-	Maintained
	4	11E + 9L ok	20L – w/spasms, heart edema, light tail necrosis, slow circulation	-	Maintained
	3	10E w/ slow heartbeat 11L – all w/ heart a little slow, 9L w/ tail problems, 1 w/ abnormal movement	12L/21L alive w/heart edema, light tail necrosis, 2 without circulation	-	11L/21L dead.
	2	4/6E dead 14L, of which 1L dead and 11 w/ necrosis in the tail	4E dead 13L dead – disintegrated 3L alive w/abnormal movement, really slow hearts, 2L without circulation and w/ tail necrosis	-	Maintained
	1	3E/9E dead. All with problems in the heart and tail 12L – necrosis in tails, no circulation, 1L dead, abnormal movement, heartbeat slow	7E deformed and dead. 1L/14L alive – without circulation, heart very very slow, abnormal movement and necrosis tail 13L dead – asymmetrical, disintegrated	-	All dead.

* renovation of the mean with the according concentration

E - embryo

L - larva

Table 4 – Table of observations of the second zebrafish test – Liposome’s plate from T₄₆ to T₅₂.

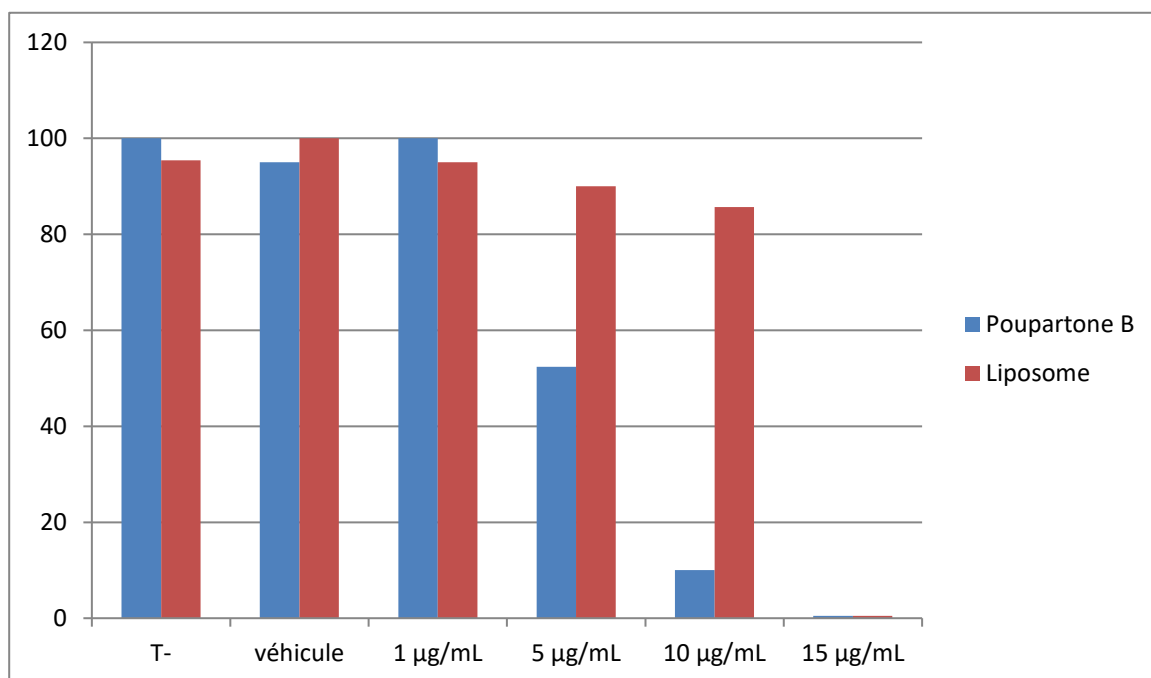
	Well	T ₂₇	T ₄₆	T ₄₈ *	T ₅₂
Liposomes	6	1L w/defect (same) 2IE ok	22L – 1L with tail necrosis and 1L w/tail necrosis and heart edema	-	Maintained .
	5	10L + 10E ok	20L – light tail necrosis, but normal movement, normal heartbeat 3L deformed of which 2L without somite	-	Maintained .
	4	8E ok 12L – 2L w/edema	20L –w/tail necrosis, heart vesicles and edemas in some, abnormal movement, 1L deformed	-	1L dead.
	3	10E – 1E deformed 11L – 1L w/ abnormal movement	21L all w/ strong tail necrosis, abnormal movement w/ spasms, heart slightly slow, some w/ edema	-	3L dead.
	2	9E – 1E deformed w/slow heartbeat 11L – 1L w/slow heartbeat	11L/20L dead – all deformed w/spasms, all with strong tail necrosis, some w/ somite, slow heartbeat, abnormal movement, difficult circulation	-	2L dead.
	1	15E -1E with slow heartbeat and deformed 2L/5L dead.	1E+19L all dead Mean very opaque. Absence of somite. Asymmetrical.	-	-

* renovation of the mean with the according concentration

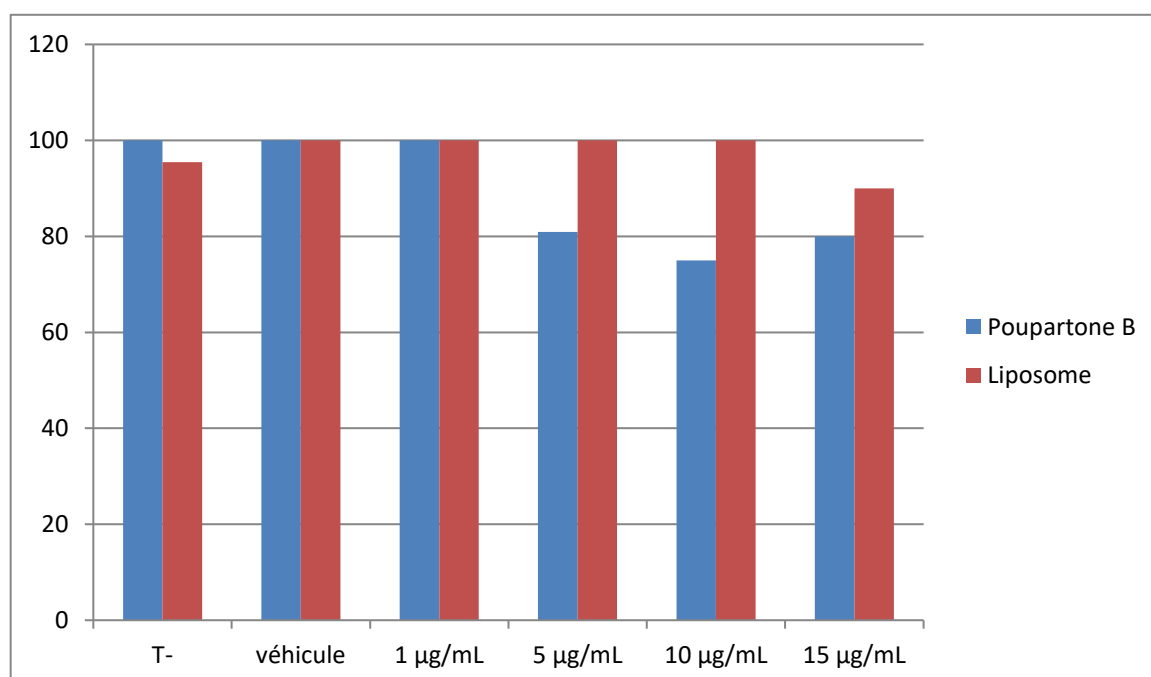
E - embryo

L - larva

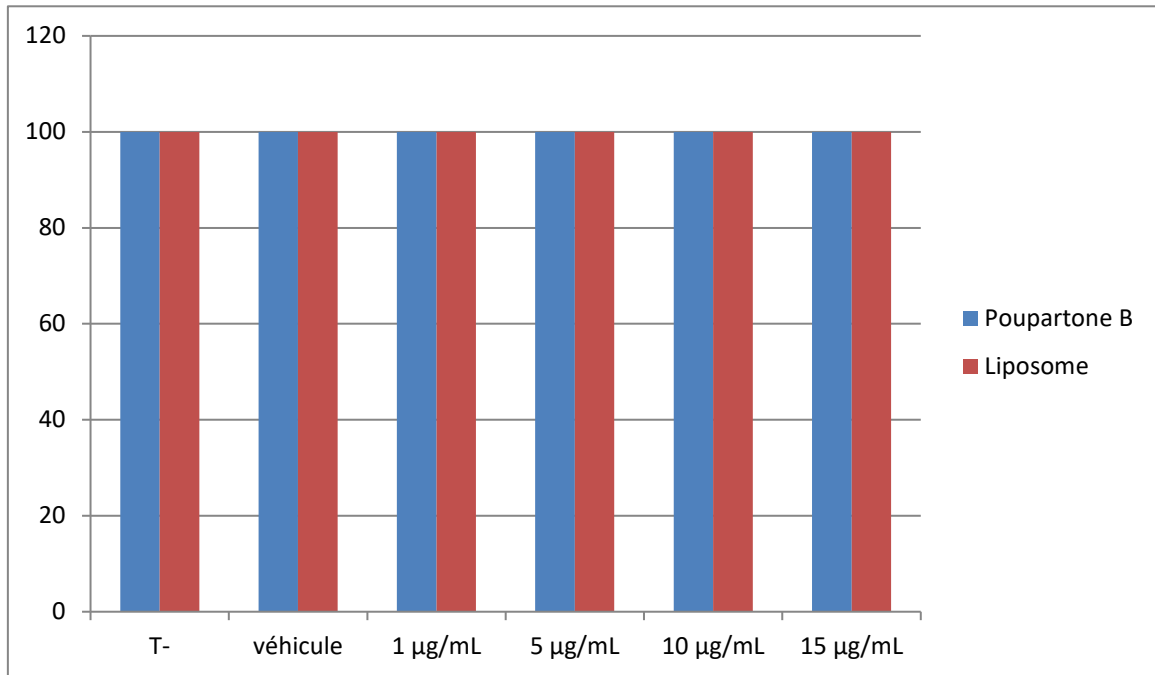
Anexo XV



Graphic 1 - Survivability (%) of the zebrafish at 72h in the second zebrafish test. (T - Control).



Graphic 2 - Survivability (%) of the zebrafish at 48h in the second zebrafish test. (T - Control).



Graphic 3 - Survivability (%) of the zebrafish at 24h in the second zebrafish test. (T - Control).



Figura I - Exemplo de etiqueta de comprimido reembalado em dose unitária. Etiqueta tem especificado o princípio ativo, a dose, a forma farmacêutica, o novo prazo de validade pós-reembalamento, o lote do medicamento original, o laboratório, o lote interno, o local do reembalamento e o número de unidade do lote interno. ULSCB.

ANEXO VII

REQUISIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E SUAS PREPARAÇÕES
 COMPREENDIDAS NAS TABELAS I, II, III E IV, COM EXCEÇÃO DA II-A,
 ANEXAS AO DECRETO-LEI N.º 15/93, DE 22 DE JANEIRO, COM
 RECTIFICAÇÃO DE 20 DE FEVEREIRO

N.º _____ / _____
 Nota de encomenda N.º _____ / _____

(Nos termos do art.º 18.º do Decreto Regulamentar n.º 61/94, de 12 de outubro)

Requisita-se a _____

SUBSTÂNCIAS ACTIVAS E SUAS PREPARAÇÕES				QUANTIDADE	
N.º de Código	Designação	Forma Farmac.	Dosagem	Pedida	Fornecida
Carimbo da entidade requisitante			D.T. ou Farmac. Responsável _____		
			N.º de insc na O. F. ____/____/____/____		
			Data ____/____/____		
			Ass. legível _____		
Carimbo da entidade fornecedora			Director Técnico _____		
			N.º de insc na O. F. ____/____/____/____		
			Data ____/____/____		
			Ass. legível _____		

Figura I - Requisição para aquisição de medicamentos estupefacientes e psicotrópicos.

ANEXO X⁵

REQUISIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS SUAS PREPARAÇÕES COMPREENDIDAS NAS TABELAS I, II, III E IV, COM EXCEÇÃO DA II-A,
 ANEXAS AO DECRETO-LEI N.º 15/93, DE 22 DE JANEIRO, COM RECTIFICAÇÃO DE 20 DE FEVEREIRO

N.º

Serviços Farmacêuticos
 do

Código
 SERVIÇO
 SALA

Medicamento (D.C.I.)	Forma Farmacêutica	Dosagem	Código

Nome do Doente	Cama/ Processo	Quantidade Pedida Ou Prescrita	Enfermeiro que administra o Medicamento		Quantidade Fornecida	Observações
			Rubrica	Data		
		Total			Total	

Assinatura legível do director de serviço ou legal substituo Data ____/____/____ N.º Mec. _____	Assinatura legível do director do serviço farmacêutico ou legal substituo. Data ____/____/____ N.º Mec. _____	Entregue por (ass. Legível) _____ N.º Mec. _____ Data ____/____/____ Recebido por (ass. Legível) _____ N.º Mec. _____ Data ____/____/____
--	--	--

⁵Com as rectificações decorrentes da Portaria n.º 1193/99, de 6 de Novembro

Figura 2 – Requisição de medicamentos estupefacientes e psicotrópicos pelos serviços clínicos.

